UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1962 N° 67

# Réactivité des souches celullaires cancéreuses humaines HeLa et K.B. vis-à-vis des hormones génitales

Travail du Laboratoire d'Histologie
de la Faculté de Médecine de Toulouse

## THESE
POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

*Présentée et soutenue publiquement en Juin 1962*

PAR

**Jean-Pierre SOLEILHAVOUP**

Ancien externe des Hôpitaux
Assistant d'Histologie à la Faculté de Médecine

MEMBRES DU JURY..
- MM. BIMES, — *Président*
- BROUSSY, DARDENNE, PLANEL — *Assesseurs.*
- BRU, — *Suppléant.*

TOULOUSE
IMPRIMERIE TOULOUSAINE
Vve R. LION
16, Rue Lakanal, 16
1962

# Réactivité des souches cellulaires cancéreuses humaines HeLa et K.B. vis-à-vis des hormones génitales

UNIVERSITE DE TOULOUSE

# FACULTE MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

## TABLEAU DU PERSONNEL

| | | |
|---|---|---|
| DOYEN. . . . . | MM. | Lazorthes. |
| 1er ASSESSEUR . . . . . | | Blanc. |
| 2e ASSESSEUR . . . . . | | N... |
| DOYENS HONORAIRES. . . . . | | Gorse, Calvet, Lefebvre, Brustier. |

### PROFESSEURS HONORAIRES

MM. Ribaut. Vallois, Clermont, Nanta, Ducuing, Tapie, Delas, Riser, Soula.

## *SECTION MEDECINE*

### PROFESSEURS

| | | |
|---|---|---|
| Clinique médicale. . . . . | MM. | Mériel, |
| Clinique médicale. . . . . | | Gadrat. |
| Clinique chirurgicale et Gynécologie. . . . . | | Fabre (P.). |
| Clinique chirurgicale et du Cancer. . . . . | | Grimoud. |
| Clinique chirurgicale infantile et Orthopédie. . . . . | | Virenque. |
| Clinique des Maladies cutanées et syphilitiques. . . . . | | Bazex. |
| Clinique des Maladies de la Tuberculose et Pathologie interne. . . . . | | Morel. |
| Clinique des maladies des voies urinaires. . . . . | | Lhez. |
| Clinique médicale infantile et Puériculture. . . . . | | Sorel (R.). |
| Clinique de Neurologie et Psychiatrie. . . . . | | Géraud. |
| Clinique obstétricale. . . . . | | Guilhem. |
| Clinique odonto-stomatologique. . . . . | | N.. |
| Clinique ophtalmologique. . . . | | Calmettes. |
| Clinique O.R.L. et de Chirurgie maxillo-faciale. . . . . | | Calvet. |
| Clinique traumatologique des membres. . . . . | | Rieunau. |
| Accouchement et Obstétricie sociale. . . . . | | Pontonnier. |
| Anatomie. . . . . | | Lazorthes. |
| Anatomie appliquée. . . . . | | Poulhès. |
| Anatomie pathologique. . . . . | | Fabre (J.). |
| Bactériologie, Hygiène, Médecine sociale. . . . . | | Andrieu. |
| Chimie biologique. . . . . | | Valdiguié (P.). |
| Electro-radiologie. . . . . | | Marquès. |
| Embryologie. . . . . | | Broussy. |
| Histologie. . . . . | | Bimes. |
| Hydrologie thérapeutique et Climatologie. . . . . | | Darnaud. |
| Médecine légale et du Travail | | Planques. |
| Médecine sociale. . . . . | | Bounhoure. |
| Parasitologie. . . . . | | Bouisset. |
| Pathologie chirurgicale. . . . . | | Dambrin. |
| Pathologie générale et Médecine expérimentale. . . . . | | Sendrail. |
| Physico-Chimie. . . . . | | Auvergnat. |
| Physiologie. . . . . | | Laporte (Y.). |
| Physiologie appliquée et Pharmacologie. . . . . | | Baisset. |
| Physique biologique et médicale. . . . . | | Bugnard. |
| Propédeutique médicale . . . . . | | N... |
| Thérapeutique. . . . . | | Dardenne. |

### PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

| | | |
|---|---|---|
| Anatomie gén. et comparée. . | MM. | Coulouma. |
| Pathologie médicale. . . . . | | Laporte J. |
| Bactériologie. . . . . | Mme | Enjalbert. |

### PROFESSEURS SANS CHAIRE

| | | |
|---|---|---|
| Biochimie médicale. . . . . | MM. | Douste-Blazy. |
| Physique médicale. . . . . | | Bru. |

### MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

| | | |
|---|---|---|
| Anatomie. . . . . | MM. | Bastide. |
| Anatomie pathologique . . . . | | Boussou. |
| Anesthésiologie. . . . . | | Lareng. |
| Carcinologie. . . . . | | Estrade. |
| Histologie et Embryologie. . . | | Planel. |
| Parasitologie . . . . . | | Ruffié (J.). |
| Pathologie expérimentale . . . . | | Gleizes. |
| Physiologie. . . . . | | Montastruc. |
| — . . . . . | | Bessou. |
| Physique médicale. . . . . | | Commanay. |

### AGREGES

| | | |
|---|---|---|
| Médecine générale. . . . . | MM. | Monnier. |
| — . . . . . | | Ribaut. |
| — . . . . . | | Delaude. |
| — . . . . . | | Calazel. |
| — . . . . . | | Rascol. |
| Chirurgie générale. . . . . | | Enjalbert. |
| — . . . . . | | Ficat. |
| — . . . . . | | Pasquié. |
| — . . . . . | | Souquet. |
| — . . . . . | | Sarrazin. |
| Dermatologie - Syphiligraphie | | Dupré. |
| Hydrologie . . . . . | | Denard. |
| Médecine légale . . . . . | | Grèzes-Rueff. |
| Obstétrique. . . . . | | Espagno. |
| Odonto-stomatologie. . . . . | | Cadenat (H.) |
| Pédiatrie. . . . . | | Bardier (A.) |

### AGREGES LIBRES

| | | |
|---|---|---|
| Anatomie. . . . . | MM. | Thomas. |
| Obstétrique. . . . . | | Déodati. |
| Oto-Rhino-Laryngologie. . . . | | Claux. |
| Pathologie chirurgicale. . . . . | | Dieulafé. |

## *SECTION PHARMACIE*

### PROFESSEURS

| | | |
|---|---|---|
| Botanique, Cryptogamie. . . . . | Mme | Dulucq-Mathou. |
| Chimie analytique, Toxicologie et Hygiène industrielle. | MM. | Bourbon. |
| Chimie pharmaceutique. . . . . | | Blanc. |
| Matière médicale. . . . . | | Vincent. |
| Pharmacie chimique et Pharmacodynamie. . . . . | | Caujolle. |
| Pharmacie galénique. . . . . | | Stanislas. |
| Zoologie. . . . . | | Roux. |

### PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

| | | |
|---|---|---|
| Pharmacie. . . . . | | M. Couturier. |

### PROFESSEURS SANS CHAIRE

| | | |
|---|---|---|
| Sciences naturelles. . . . . | Mme | Caujolle. |

### MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

| | | |
|---|---|---|
| Microbiologie. . . . . | MM. | Breuillaud. |
| Sciences physiques. . . . . | | Pitet. |
| Toxicologie. . . . . | | Broussy G. |

## *PERSONNEL ADMINISTRATIF*

| | | |
|---|---|---|
| Secrétaire principal. . . . . | MM. | Roche. |
| Secrétaire. . . . . | | Berrut. |

*La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats.*
(Délibération en date du 12 mai 1891.)

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1962 N° 67

# Réactivité des souches celullaires cancéreuses humaines HeLa et K.B. vis-à-vis des hormones génitales

Travail du Laboratoire d'Histologie
de la Faculté de Médecine de Toulouse

## THÈSE
## POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

*Présentée et soutenue publiquement en Juin 1962*

PAR

**Jean-Pierre SOLEILHAVOUP**
Ancien externe des Hôpitaux
Assistant d'Histologie à la Faculté de Médecine

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

MEMBRES DU JURY..
- MM. BIMES, — *Président*
- BROUSSY
- DARDENNE — *Assesseurs.*
- PLANEL
- BRU, — *Suppléant.*

TOULOUSE
IMPRIMERIE TOULOUSAINE
Vve R. LION
16, Rue Lakanal, 16
1962

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546525_0074

A MES GRANDS-PARENTS

A MES PARENTS

A MA FEMME

A MES BEAUX-PARENTS

A TOUS LES MIENS

A MES MAITRES DE LA FACULTÉ
ET DES HOPITAUX

A MES CAMARADES D'EXTERNAT
ET DU LABORATOIRE D'HISTOLOGIE

A MES AMIS

# Avant-propos

Nous ne saurions entreprendre l'exposé de ce travail sans témoigner tout d'abord notre respectueuse gratitude à notre Jury de Thèse :

A M. le Professeur Charles BIMES, qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre Jury de Thèse. Qu'il trouve ici l'expression de notre respectueuse reconnaissance pour la haute bienveillance qu'il n'a cessé de nous témoigner en nous accueillant dans son laboratoire dès le début de nos études médicales et en nous faisant le grand honneur de nous compter parmi ses élèves.

A M. le Professeur Jean BROUSSY, pour l'intérêt et la grande sympathie qu'il a toujours daigné nous porter. Nous le remercions de sa bienveillante sollicitude et de l'honneur qu'il nous fait en acceptant d'être notre juge.

A M. le Professeur Pierre DARDENNE, qui nous a prodigué, en même temps que son brillant enseignement, son sens profond du respect humain. Avec notre respectueuse reconnaissance pour l'intérêt qu'il a bien voulu nous témoigner dans son service, nous lui exprimons ici notre profonde admiration.

A M. le Professeur Hubert PLANEL, qui nous a donné le sujet de ce travail et nous a constamment dirigé et aidé dans sa réalisation. Dès le début de nos études médicales, il nous a conduit à l'histologie et n'a cessé ensuite d'exalter en nous le goût de la recherche scientifique. Nous lui demandons de trouver ici l'assurance de notre grande reconnaissance et de notre profond attachement.

A M. le Professeur André BRU, que nous remercions de la bienveillance dont il a toujours fait preuve à notre égard et de l'honneur qu'il nous fait en siégeant à notre Jury de Thèse.

Nos remerciements vont également au Docteur André GUILHEM, Maître de Conférence Agrégé, qui nous a toujours dispensé sans réserve ses conseils éclairés. Qu'il trouve ici l'expression de notre attachement sincère.

Nous tenons à remercier tout particulièrement le Docteur Jean-Frédéric DAVID, Chef de Travaux d'Histologie, pour sa collaboration étroite dans ce travail qui est aussi le sien. Il nous a initié avec patience aux difficultés de la culture de tissu en nous faisant profiter de toute son expérience. Nous lui demandons de trouver ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre amitié.

Nos remerciements s'adressent enfin à M^lle^ DEGARDIN, pour sa précieuse collaboration technique, ainsi qu'à M^lle^ TRÉMOSA, M^lle^ GALVANI, M. CLANET et tout le personnel du Laboratoire d'Histologie.

# Plan

INTRODUCTION.

RAPPEL DES RECHERCHES ANTÉRIEURES CONCERNANT :

— *l'action des hormones en culture d'organe ;*
— *l'action des hormones en culture de tissu ;*
— *l'action des hormones sur les tissus cancéreux.*

LES SOUCHES CELLULAIRES HeLa ET K.B.

Nous étudierons successivement pour chaque souche :

— *l'origine,*
— *la morphologie,*
— *les caractères histochimiques,*
— *Les caractères physiologiques,*
— *le mode de croissance,*
— *les critères de stabilité.*

LES TECHNIQUES DE CULTURE.

— *Milieu normal et milieu supplémenté en hormones.*
— *Cultures d'entretien et cultures expérimentales.*
— *Méthodes d'appréciation de la croissance cellulaire.*

RÉSULTATS.

— *Etude critique,*
— *Etude analytique,*
— *Etude comparative.*

Discussion.

— *La valeur des méthodes expérimentales utilisées.*
— *Les recherches antérieures sur la souche HeLa.*
— *L'activité classique des hormones génitales* in vitro *et* in vivo.
— *L'activité particulière de ces hormones sur les souches HeLa et K.B.*
— *L'index mitotique et le mécanisme de l'action hormonale.*

Conclusions générales.

Bibliographie.

# Introduction

De nombreux faits d'observation clinique, confirmés ensuite par une série de travaux expérimentaux, ont depuis longtemps mis en évidence le rôle indiscutable des hormones sur les processus néoplasiques. Qu'il s'agisse de tumeurs spontanées chez l'homme, ou induites sous l'action de divers facteurs cancérigènes chez l'animal, les hormones peuvent en effet influencer, dans un sens comme dans l'autre, le développement des tumeurs malignes.

C'est essentiellement au niveau de la sphère génitale, et plus particulièrement au niveau des tissus dont l'évolution est étroitement liée à l'imprégnation hormonale, que les relations entre hormones et cancer apparaissent avec le plus de netteté. Il n'existe souvent plus de parallélisme entre les réactivités des éléments normaux et cancéreux, mais les hormones sexuelles se révèlent toujours capables, dans ce cas, d'activer ou, inversement, d'inhiber la croissance du processus tumoral.

Plus encore qu'une action secondaire sur le développement de la néoplasie, les hormones génitales peuvent agir directement sur sa genèse. On sait ainsi, depuis le travail inaugural de LACASSAGNE, en 1932, que ces principes hormonaux peuvent induire la cancérisation des tissus normaux. On peut, dès lors, se demander quel est le rôle de ces facteurs endocriniens dans la

transformation irréversible qui fait de la cellule normale une cellule cancéreuse. Certes, à l'heure présente, on a su mettre en évidence l'importance fondamentale du stroma qui entoure la cellule, et l'on tend à considérer le tissu dans son ensemble comme l'ultime unité physiologique.

Cependant il ne paraît pas inutile d'aborder le problème à l'échelle cellulaire et de rechercher s'il existe ou non des réactions propres à la cellule cancéreuse maintenue isolée, en essayant de les préciser. C'est la possibilité d'utiliser actuellement des souches cellulaires tumorales humaines, de caractère bien défini et de croissance continue, qui nous a permis d'aborder ce problème, les souches HeLa et K.B. représentant en effet un matériel de choix, comme nous le montrera leur étude.

Par ailleurs nous avons été conduit à entreprendre ces investigations par le fait que les hormones peuvent effectivement exercer leur activité, en dehors de l'organisme, sur des éléments cellulaires cultivés *in vitro*. Nous rappellerons ces notions en exposant brièvement, dans un premier chapitre, les résultats des principaux travaux antérieurs concernant l'action des hormones en culture d'organe, en culture de tissu et, plus précisément, de tissus cancéreux.

CHAPITRE PREMIER

# Recherches antérieures sur l'action des hormones in vitro

## I. — Action des hormones en culture d'organes

Nombreuses sont les hormones qui continuent à exercer, sur des organes cultivés *in vitro*, une action comparable à celle déjà constatée chez l'animal.

### 1° *Les hormones en général*

L'*hormone parathyroïdienne* provoque ainsi la résorption du tissu osseux (Gaillard 1955[1], 1955[2], 1957[1], 1959), notamment au niveau d'explants d'os pariétal de Souris embryonnaires. Cette résorption s'accompagne de réaction ostéoclasique identique à celle que l'auteur avait préalablement observée en cultivant côte à côte un fragment osseux et un fragment de parathyroïde humaine (Gaillard, 1951).

La *thyroxine* peut, comme chez l'animal, exercer une action stimulante sur la croissance osseuse en favorisant la maturation des cellules cartilagineuses appartenant à des ébauches d'humérus embryonnaires

(Fell, 1954 ; Fell et Mellamby, 1955). Par contre, ces mêmes auteurs signalent une action toxique de l'hormone, entraînant la dégénérescence des chondroblastes, lorsqu'il s'agit d'explants osseux plus âgés, les premières observations étant d'ailleurs essentiellement valables pour des rudiments d'humérus, car les autres os présentent des réactivités différentes. Pour Leslie et Sinclair (1959), l'hormone thyroïdienne et ses précurseurs sont inactifs à la concentration de $10^{-7}$ M. sur la croissance de la langue fœtale, ils sont par contre inhibiteurs à la concentration de $10^{-4}$ M. qui paraît proche de la concentration physiologique.

Les *hormones corticosurrénaliennes* ont fait elles-mêmes l'objet de nombreuses recherches. La cortisone agit ainsi sur la croissance de fémurs d'embryons de Poulets âgés de sept jours (Buno et Goyena, 1955), ainsi que sur de nombreux autres organes embryonnaires (Ruskin, Pomerat et Ruskin, 1951). La cortisone provoque également, comme chez l'animal au cours du stress, des altérations dégénératives des lymphocytes de ganglions lymphatiques prélevés chez de jeunes Rats (Trowell, 1953).

L'*insuline* assure la conservation de la structure histologique de fragments de glandes mammaires de Souris, notamment en association avec la cortisone (Elias, 1957-1959). L'insuline favorise aussi la synthèse du glycogène et accélère le dépôt de lipides dans la graisse brune interscapulaire du Rat (Sidman, 1956). Elle augmente également l'activité cinétique dans des fragments d'épiderme, l'hormone agissant ici en favorisant l'utilisation du glucose par les cellules épithéliales (Bullough, 1954).

L'*hormone somatotrope hypophysaire* favorise la croissance de fémurs ou de tibias d'embryons de Poulet (Hay, cité par Lasnitzki, 1958).

Elle inhibe par contre l'activité cinétique dans le tégument de la Souris (Bullough, 1954).

L'*hormone corticotrope hypophysaire* (Schaberg, 1957) peut agir *in vitro* directement sur des cultures de surrénales. En l'absence d'A.C.T.H., la zone fasciculée dégénère et seuls des îlots de la zone glomérulée survivent. Si l'A.C.T.H. est ajoutée à la concentration de 0,1 U.I./ml, la taille des cellules augmente et la zone fasciculée se reconstitue *in vitro* à partir de la zone glomérulée. Le même effet est constaté par Gaillard (1957 2), qui utilise des doses d'A.C.T.H. variant entre 2 U.I. et 0,02 U.I./ml. Cet auteur obtient des résultats identiques en mettant côte à côte en culture les fragments de la zone glomérulée et des explants frais d'hypophyse antérieure. Safran, Grad et Bayliss (1952) ont d'ailleurs montré que la sécrétion de stéroïdes *in vitro* par des fragments de surrénale de Rat est directement proportionnelle à la quantité d'A.C.T.H. ajoutée au milieu de culture.

### 2° *Les hormones génitales*

Les hormones génitales elles-mêmes ont été particulièrement étudiées. Leur action *in vitro* est, en grande partie, identique à celle observée chez l'animal.

— L'*œstradiol*, utilisé sur des organes embryonnaires de Poulet, stimule ainsi le développement du canal de Müller. Il provoque de même, à fortes doses, une légère accélération de la croissance d'ébauches embryonnaires de fémurs (Goyena, 1955).

L'œstrogène provoque, inversement, la régression du canal de Wolff (Wolff, Lutz-Ostertag et Haffen, 1952 ; Scheib-Pfleger, 1955). Cette régression est également observée sur les organes embryonnaires du Rat (Price et Pannabecker, 1956). Ces faits nous montrent que l'œstradiol peut manifester aussi bien une

action favorable qu'une action inhibitrice *in vitro*. Le ralentissement de développement de la syrinx de l'embryon de Canard sous l'influence de cette hormone est un autre exemple du pouvoir inhibiteur que peut présenter l'hormone femelle (Wolff, 1950). Ajoutons que l'œstradiol inhibe également le développement de glandes mammaires embryonnaires de Souris. Cette inhibition disparaît si l'on ajoute de la progestérone au milieu de culture (Lasfargues et Murray, 1959).

Par ailleurs, les œstrogènes sont capables d'exercer leur activité sur des organes non embryonnaires, notamment au niveau de la sphère génitale :

— les œstrogènes sont ainsi capables de favoriser l'hyperplasie et la kératinisation de l'épithélium utéro-vaginal prélevé chez de jeunes impubères ou chez des animaux adultes de diverses espèces. Nous reviendrons ultérieurement en détail sur cette question ;

— au niveau de la glande mammaire, l'œstradiol peut provoquer une nécrose des formations conjonctives, mais stimule légèrement les formations épithéliales (Lasfargues, 1960) ;

— au niveau de la prostate, des explants prélevés chez des Souriceaux de six semaines paraissent indifférents à la présence de l'hormone dans le milieu de culture (Lasnitzki, 1954, 1955, 1958) ; par contre, sur des prostates explantées à partir de Souris âgées de six mois, l'activité de l'œstradiol est rapide et se manifeste par une atrophie marquée de l'épithélium alvéolaire accompagnée d'une intense stimulation du stroma fibro-musculaire. Ces résultats sont retrouvés par Franks (1959), cet auteur ayant constaté une atrophie épithéliale accompagnée d'un ralentissement de la sécrétion. Cet effet dépressif de l'œstrone est surtout marqué pour les explants provenant de Souris âgées de un à six mois. Wagenseil (1956), qui a étudié l'évolution d'explants provenant des trois parties de la glande, ne constate aucun effet de l'œstrone, même à la concentration de

3 µg par litre de milieu de culture. De même, Bengmark, Ingemanson et Kallen (1959) n'ont pas obtenu de modification de la croissance de prostates de Rat après addition d'œstradiol pur cristallisé au milieu de culture.

L'action de l'œstradiol a également été étudiée sur des prostates humaines par Kallen et Rohl (1960). Des cultures provenant d'adénomes prostatiques sont peu affectées par l'addition d'œstradiol ; quelques cultures présentent cependant une inhibition de leur croissance. Breuer (1957), qui a utilisé le même matériel et des concentrations de 10 à 100 µg d'œstradiol 17 β par litre, a constaté une augmentation de la consommation d'oxygène et de la glycolyse aérobie, indépendante du type histologique de l'adénome.

— La *progestérone* exerce un effet nocif marqué sur la glande mammaire de la Souris. Ajoutée au milieu de culture en présence d'œstradiol, les deux effets également inhibiteurs de ces hormones semblent s'annuler, permettant ainsi la différenciation des formations tubulo-acineuses (Lasfargues et Murray, 1959, 1961).

— La *testostérone* peut manifester son activité *in vitro* de plusieurs façons :

— elle peut provoquer la régression et la nécrose rapide des canaux de Müller de l'embryon de Poulet (Wolff, Lutz-Ostertag et Haffen, 1952) ; inversement, elle favorise le développement des canaux de Wolff (Price et Pannabecker, 1959) ;

— la testostérone, comme l'œstradiol d'ailleurs, provoque la différenciation du syrinx embryonnaire de Canard vers le type femelle (Wolff et Wolff, 1953) ;

— au niveau de la prostate, elle permet la différenciation normale de la glande, lorsque celle-ci est prélevée chez des Souris âgées seulement de quatre à six semaines. Les mêmes doses de testostérone, appliquées à des glandes prélevées chez des animaux âgés de cinq

à six mois, assurent non seulement le maintien des structures histologiques, mais provoquent aussi une importante réaction hyperplasique de l'épithélium glandulaire (Lasnitzki, 1955). Ces résultats ont été confirmés par Franks (1959). Par contre, Bengmark et collaborateurs (1959), en ajoutant de la testostérone pure cristallisée à des cultures de tissu prostatique de Rat, n'ont constaté aucune modification de la croissance d'explants ; il est possible toutefois que l'action de l'hormone mâle ait été neutralisée par le plasma de Chapon utilisé dans ces expériences, car ce plasma seul inhibe le développement du tissu prostatique.

L'action de la testostérone a été également étudiée sur la prostate humaine. C'est ainsi que Breuer (1957) a montré qu'aux doses de 10 et 100 µg par litre de milieu de culture, la testostérone augmente le taux de consommation en oxygène et la glycolyse aérobie de fragments d'adénome prostatique. Les récents travaux de Rohl (1959) et de Kallen et Rohl (1960) n'ont cependant pas permis de préciser le rôle de l'hormone mâle sur ce matériel humain.

Rohl, qui a en effet examiné 2 719 cultures d'adénome prostatique, a montré que l'action de l'androstérone variait suivant la nature histologique des tumeurs explantées, l'amélioration du taux de croissance étant, en général, peu significative.

## II. — Action des hormones en culture histiotypique

A. — *La majorité des recherches poursuivies dans ce sens a été consacrée à l'influence des hormones sur la croissance fibroblastique que nous envisagerons en premier lieu.*

Les *hormones surrénaliennes* ont fait notamment l'objet d'un nombre important de travaux visant à préciser leur activité sur ce type cellulaire.

— La cortisone exerce un effet inhibiteur très marqué sur la croissance fibroblastique. Ainsi, l'addition d'une goutte d'une solution huileuse contenant 2,5 mg d'hormone par millilitre, ou l'utilisation d'un plasma additionné de cortisone, ou l'emploi de plasma prélevé chez des animaux préalablement traités par la cortisone, inhibent entièrement la croissance du fibroblaste de cœur de Poulet (Barber et Delaunay, 1951). Une action également défavorable a été observée par Cornman (1951) pour des doses variant de 0,05 à 0,15 mg par millilitre de milieu de culture.

Lors de cultures mixtes, épithéliales et conjonctives, une action inhibitrice de la cortisone sur la croissance fibroblastique peut d'ailleurs être utilisée dans le but d'obtenir des cultures pures, de nature strictement épithéliale (Grossfield et Ragan, 1954, 1958 ; Franklin et Sinclair, 1959).

Cependant, Gerger, Dingwall et Andrus (1956), n'ont pas retrouvé cet effet inhibiteur de la cortisone sur le fibroblaste embryonnaire. Les doses qu'ils utilisent varient de 0,001 à 0,1 mg par millilitre et sont actives sur le fibroblaste adulte.

— Trois dérivés de la cortisone : l'acétate de cortisone, l'hémisuccinate d'hydrocortisone et une fluorocortisone, présentent également un effet inhibiteur vis-à-vis de la croissance du fibroblaste de cœur d'embryon de Poulet (Jambon et Flandre, 1959). Ces auteurs utilisent des doses variant de 0,5 µg à 25 µg par millilitre. Les trois hormones ont une action inhibitrice totale sur la croissance cellulaire pour la concentration de 5 µg par millilitre. Elles n'ont, en outre, aucune activité sur la mitose.

— L'hydrocortisone agit dans le même sens et proportionnellement aux doses utilisées sur le fibroblaste de Poulet (Lenti et coll., 1956). A la concentration de 1 g par litre, ces auteurs constatent une diminu-

tion nette de la croissance cellulaire s'accompagnant d'une chute brutale de l'index mitotique. GROSSFIELD (1958-1959) a montré que cette hormone, utilisée à la concentration de 125 µg par litre, provoque d'autre part une diminution de la respiration cellulaire, une augmentation de la glycolyse anaérobie ainsi qu'une chute de la production de mucopolysaccharides par le fibroblaste. Au contraire, de faibles concentrations (1 µg ‰) sont favorables et stimulent les phénomènes respiratoires.

— La désoxycorticostérone aurait le même pouvoir inhibiteur que la cortisone (BARBER et DELAUNAY, 1951 ; CORNMAN, 1951). Cet effet n'a cependant pas été retrouvé par NANCINI et SACERDOTE DE LUSTIG (1951) et il y aurait même, d'après ces auteurs, un antagonisme entre la désoxycorticostérone et la cortisone, la première semblant en effet stimuler la croissance fibroblastique ainsi que la production de glucoprotéines intracellulaires et la formation de mucopolysaccharides soufrés intercellulaires.

L'*hormone corticotrope* (A.C.T.H.) n'a pas d'effet sur les fibroblastes adultes et embryonnaires de Poulet lorsqu'elle est utilisée à la concentration de 0.4 mg % (GERGER et coll., 1956).

L'*hormone somatotrope* agit directement, comme l'a montré MONESI (1956 2), sur la croissance du fibroblaste de Poulet. A la concentration de 1/1 000 000, elle augmente la croissance de 27 % : à la concentration de 1/100 000, la croissance est inhibée. Cet effet paradoxal de la S.T.H. pourrait s'expliquer, à ces fortes doses, par son pouvoir gluco-inhibiteur. Une expérimentation comparable et des résultats identiques permettent à VALERIO (1956) d'aboutir aux mêmes conclusions. Cette activité de l'hormone somatotrope n'est d'ailleurs pas spécifique du fibroblaste de Poulet et la S.T.H. favorise également la croissance et la synthèse protéique du fibroblaste embryonnaire de Rat (MOON et VINCENT, 1957).

Le *Glucagon* est inactif à la concentration de 1/1 000 000, par contre il augmente la croissance de 28,65 % à la concentration de 1/200 000 et de 44,15 % à la concentration de 1/100 000 (Monesi, 1956 3). Siminovitch, participant aux travaux de Goranson et collaborateurs (1959), a également étudié l'action du glucagon sur une lignée de fibroblastes de Souris, la souche L de Earle. Des concentrations de 7 µg et de 10 µg/ml n'ont aucune action sur la croissance de ces cellules après quarante-huit heures de culture.

La *thyroxine*, dont on connaît l'action *in vivo* sur de nombreux tissus conjonctifs et en particulier sur les tissus de soutien, a des effets encore mal précisés sur les cultures de fibroblastes. Ainsi les recherches, d'ailleurs anciennes, de Semura (1931), Vogelaar et Erlichman (1936), Verne et Odiette (1936), Latta et Davis (1938), von Hamm et Cappel (1940), n'ont abouti qu'à des résultats contradictoires.

*Les hormones génitales :* leur action a été également étudiée sur le fibroblaste de Poulet. D'après von Hamm et Cappel (1940), l'œstrone aurait un effet légèrement favorable pour des concentrations de $10^{-7}$ M., $10^{-9}$ M. Par contre, l'hormone femelle aurait une action inhibitrice à des concentrations plus fortes. Pour le même auteur, la progestérone et la testostérone présentent un même effet inhibiteur, même à la concentration de $10^{-7}$ M. seulement. L'effet inhibiteur de l'œstrone et de la testostérone a été également signalé par von Mollendorff (1942). Les récents travaux de Kawada (1959) viennent confirmer ces résultats. Cet auteur constate un effet légèrement inhibiteur du benzoate d'œstradiol utilisé aux doses de 0,3 et 3 µg par litre, mais qui atteint 10 % environ pour 30 µg par litre de milieu. De même la progestérone, peu active aux concentrations de 0,03 et 0.3 mg/litre, devient inhibitrice dans les mêmes proportions à la dose de 3 mg

par litre. Ces effets, peu apparents au deuxième jour, sont très nets aux quatrième et septième jours de culture.

— Lettre et Flandre (1959) ont également étudié sur le fibroblaste l'action de précurseurs des hormones stéroïdes et notamment l'action de cristaux de cholestérol placés au contact des cultures fibroblastiques. Ces cristaux provoquent une inhibition de la croissance cellulaire.

B. — *Mais en dehors des fibroblastes, d'autres éléments cellulaires peuvent également subir, en culture histiotypique, des modifications particulières sous l'influence de produits hormonaux.*

— La *cortisone* en particulier est encore capable d'exercer, comme elle le fait *in vivo*, une action défavorable sur les lymphocytes. Cette hormone ou ses dérivés provoquent ainsi leur cytolyse (Frank et Dougherty, 1953), diminuent leur capacité d'incorporation du carbone radioactif (Kits et Barrow, 1953) et inhibent leur croissance (Jedekin et White, 1958). D'autre part, Krzymien (1956) a montré que la cortisone favorise l'activité phagocytaire des polynucléaires, bien qu'elle puisse provoquer leur destruction lorsqu'elle est utilisée à des doses élevées (Feldman, 1952).

— L'*hormone somatotrope* peut également agir directement sur les cellules hépatiques *in vitro*. Moon, Jentoft et Li (1962) signalent en effet une stimulation nette de la lignée hépatique de Chang par des concentrations d'hormone variant de 75 à 300 µg/ml pendant soixante-douze heures.

— Les *hormones génitales* conservent également leur activité dans ces conditions.

Verne (1935), le premier, a étudié la croissance de lames épithéliales à partir d'explants provenant de cornes utérines de Rates âgées de deux à trois mois. La

folliculine, huileuse ou cristallisée, administrée directement dans le milieu, ne modifie pas la croissance des cellules épithéliales. L'utilisation d'un sérum provenant d'une femelle traitée par de l'œstrogène favorise par contre la croissance des lames épithéliales. Des résultats négatifs ont été obtenus par Emmens et Ludford (1940) après addition d'œstradiol au milieu de culture (une goutte d'une solution huileuse contenant 1 mg d'hormone par millilitre). Enfin, plus récemment, Brmes, Planel et David (1961) ont constaté que l'œstradiol ou la testostérone cristallisées, utilisées en solution alcoolique à des concentrations variant de 0,2 à 20 γ/ml de milieu, n'apportaient pas de modifications significatives de la croissance des lames épithéliales à partir d'explants provenant de corne utérine de Rates âgées de cinq à dix jours.

***

Les faits que nous venons de rapporter montrent que la plupart des hormones peuvent exercer leur activité sur des éléments cellulaires cultivés *in vitro*. Ils permettent également de formuler les trois remarques suivantes :

— Les hormones agissant sur des éléments cellulaires cultivés en dehors de l'organisme, on pourrait penser que ces composés exercent leur activité directement sur les organes récepteurs. On ne peut cependant tirer de telles conclusions de l'ensemble des recherches expérimentales que nous venons de rapporter. En effet dans le cas des cultures organo-typiques, il est possible que des éléments cellulaires, comme des cellules conjonctives ou des cellules interstitielles nerveuses, contenues dans le chorion des organes effecteurs, puissent jouer le rôle d'intermédiaires entre l'hormone et le tissu épithélial récepteur. A l'appui de cette notion, rappelons que Lasnitzki (1958) a montré que des fragments de peau ou de muqueuse vaginale dégé-

rent en culture d'organe si l'épithélium est détaché du chorion. De même, les formations épithéliales des ébauches thymiques ne se développent qu'en présence des formations conjonctives de cet organe (AUERBACH, 1960). Par ailleurs, l'effet morphogène des œstrogènes ne se manifeste qu'en culture organotypique ;

— Les hormones n'exercent pas systématiquement une action favorable sur la croissance ou la différenciation cellulaire. Elles peuvent au contraire exercer une action inhibitrice ;

— L'action des hormones dépend en grande partie des doses utilisées et peut même s'inverser en fonction des concentrations choisies.

## III. — ACTION DES HORMONES EN CULTURE DE TISSUS CANCÉREUX

Parallèlement aux nombreuses recherches poursuivies *in vivo* sur le rôle des hormones dans la genèse de diverses tumeurs expérimentales ou sur la croissance de tumeurs transplantables, un certain nombre de travaux ont montré, au cours de ces dernières années, que les hormones peuvent également manifester leur activité sur des tissus néoplasiques cultivés *in vitro*.

Si l'on exclue des travaux d'ELIAS et RIVIERA (1959), consacrés à l'étude de l'action des différentes hormones sur des fragments de tissus mammaires en état d'hyperplasie précancéreuse et cultivés en verre de montre, les recherches poursuivies sur l'activité des hormones *in vitro* ont utilisé essentiellement les techniques de la culture histiotypique.

1° *En dehors des hormones génitales*, l'action d'un certain nombre d'hormones a été étudiée :

*Des extraits hypophysaires totaux* favorisent la croissance du carcinome mammaire de la Souris (OTANI,

1959), et cet auteur a retrouvé, mais à un degré moindre, le même effet pour le fibroblaste de Poulet. D'après Rabotti (1956), l'hormone corticotrope et l'hormone somatotrope ont une action franchement stimulante sur la croissance des cellules du carcinome de Walker, tandis que les hormones F.S.H. et I.C.S.H. ne produisent pas d'effet favorable.

La *thyroxine* se montre inhibitrice sur la prolifération des cellules carcinomateuses H.E.P. 1 et H.E.P. 2, mais augmente l'importance de la glycolyse à la concentration de $10^{-4}$ M., proche de la concentration physiologique (Leslie et Sinclair, 1959). Ces effets disparaissent aux doses plus faibles de $10^{-7}$ M.

Les *hormones surrénaliennes* sont également capables d'exercer une influence sur le tissu cancéreux. L'hydrocortisone présente notamment un effet toxique qui persiste même lorsque les cellules ont été remises dans un milieu de culture normal. Ces faits ont été observés par Kline et collaborateurs (1957) sur les souches Leigton's D 189, HeLa et K.B., les doses utilisées variant de 10 à 1 000 µg/ml. Franklin (1960) signale que l'aldostérone, à la concentration de 0,1 mg % fait apparaître un aspect plus ou moins granuleux, dégénératif, dans les cultures des cellules HeLa. Ce même auteur a signalé, d'autre part, l'effet toxique de la prednisolone à la dose élevée de 10 mg %, car cette même hormone est nettement moins active à des concentrations plus faibles. L'addition d'acétate d'hydrocortisone dans le milieu contenant déjà de la prednisolone ne modifie en rien l'activité de cette dernière.

2° Les *hormones génitales* ont fait l'objet d'un nombre plus important de recherches et l'étude de leurs effets a été pratiquée sur des éléments cellulaires de nature variée.

Plus précisément, l'activité des hormones génitales a été étudiée soit sur des éléments cellulaires dévelop-

pés à partir d'explants provenant eux-mêmes de tumeurs spontanées ou expérimentales, soit sur des souches cellulaires se prêtant à la culture continue.

I. — Un certain nombre de recherches a porté sur l'adénocarcinome d'Ehrlich. Monesi (1956 1, 1956 4) a étudié, sur ce matériel cellulaire, l'activité de l'œstradiol, de la progestérone et de la testostérone. L'auteur a cherché à préciser l'action de ces hormones en mesurant, par rapport au témoin, l'augmentation d'étendue des zones de migration cellulaire, à partir d'explants, sur des cultures âgées de quinze jours. D'après Monesi, l'œstradiol, à la concentration de $5.10^{-5}$ g/ml, favorise considérablement la croissance cellulaire, le taux d'accroissement étant de 400 %. Cet effet ne se produit qu'au niveau des cellules épithéliales. La progestérone exerce également un effet favorable, mais cet effet qui est de + 308 % à la concentration de $1.10^{-5}$ g/ml tombe à + 39 % seulement pour la concentration de $5.10^{-5}$ g/ml. La progestérone stimule, en outre, la croissance des fibroblastes du stroma. La testostérone, à l'inverse de l'œstradiol, inhibe le développement cellulaire, dans la proportion de 66 % à la concentration de $1.10^{-5}$ g/ml et de 29 % pour la concentration de $5.10^{-5}$ g/ml. La testostérone est peu active sur le stroma.

Rota (1958) a confirmé ce rôle de la testostérone sur ce même matériel cellulaire et dans les mêmes conditions expérimentales, l'hormone étant utilisée sous forme de testostérone, méthyltestostérone et fluorotestostérone à la dose de 50 et 100 µg/ml. L'inhibition de la croissance cellulaire, qui atteint 60 % environ pour 100 µg/ml, s'accompagne de profondes altérations cellulaires.

Les travaux de Monesi ont été repris par Otani (1959). Cet auteur a confirmé l'action favorable de l'œstradiol utilisé à faible dose. Il a en outre montré que des doses élevées tendaient au contraire à inhiber

la croissance cellulaire. La progestérone aurait le même effet que l'œstradiol et la testostérone potentialiserait l'activité œstrogénique.

II. — L'action des hormones génitales a porté également sur des éléments cellulaires provenant de tumeurs expérimentales. C'est ainsi que KULLANDER et KALLEN (1959) ont étudié l'activité de l'œstrone, de la progestérone et de l'androstérone sur des tumeurs ovariennes de type arrénoblastome développées à partir de greffes intraspléniques chez le Rat castré. Ils comparent à un témoin les surfaces des explants au troisième jour de culture. L'œstrone, à la dose de 15 µg/ml, est pratiquement sans effet. La progestérone, à la dose de 80 µg/ml, ne provoque une inhibition de croissance que dans un cas sur cinq. L'androstérone enfin, à la dose de 25 µg/ml, est nettement inhibitrice (trois cas sur sept).

DONTENWILL et WRBA (1959 1, 1959 2) ont étudié, *in vitro*, la sensibilité hormonale d'une tumeur rénale créée expérimentalement chez le Hamster par administration prolongée d'œstrogènes (cyren A et B). Les éléments cellulaires tumoraux voient leur croissance accrue par l'apport, dans le milieu de culture, de sérum de Hamster traité aux œstrogènes. Cet effet favorable constaté sur la croissance des cellules épithéliales est en rapport avec une inhibition consécutive de la prolifération fibroblastique.

III. — Les hormones génitales peuvent enfin exercer leur activité sur des souches cellulaires se prêtant à la culture continue.

Ainsi les œstrogènes contenus dans le sérum humain placentaire, ou le liquide amniotique de Bœuf, sont capables d'agir sur la croissance d'une souche cellulaire isolée à partir d'un adénocarcinome mammaire humain (LASFURGUES et OZZELLO, 1958). Les œstrogènes ont, dans ce cas, un effet favorable.

La croissance des cellules du sarcome de Yoshida est également modifiée par les hormones génitales, comme l'ont montré les travaux de KAWADA (1959), par des numérations cellulaires aux deuxième, quatrième et sixième jours de culture. Vis-à-vis de ces éléments cellulaires, le benzoate d'œstradiol est pratiquement inactif aux concentrations de 0,3, 3 et 30 µg par litre. Par contre, aux mêmes concentrations, un œstrogène de synthèse, le robal, se révèle constamment inhibiteur, mais avec un taux très faible, de l'ordre de — 5 %. La progestérone, très légèrement inhibitrice aux doses de 0,03 et 0,3 mg par litre, exerce au contraire un léger effet favorable pour 3 mg par litre. La testostérone n'a pas été utilisée.

Enfin, la souche HeLa elle-même a été étudiée par KAWADA (1959), SOMEYA (1960), TAKAOKA et collaborateurs (1960 1) et par FRANKLIN (1960). Tous ces auteurs s'accordent pour constater que les trois hormones génitales exercent vis-à-vis de cette souche une action inhibitrice. Nous reviendrons en détail sur ces éléments lors de la discussion de nos résultats.

Ajoutons que la souche cellulaire K.B. n'a pas été étudiée par ces auteurs.

*
**

L'exposé fastidieux de ces nombreux travaux nous permet de conclure à la possibilité d'une action directe *in vitro* des hormones génitales, non seulement sur la croissance des cellules normales, mais encore sur la prolifération des cellules tumorales, notamment des cellules HeLa.

Le but de nos recherches est de préciser l'action des trois hormones sexuelles sur la souche HeLa, ainsi que sur une autre souche tumorale, la souche K.B., afin d'établir s'il existe ou non une différence de réactivité entre ces deux souches néoplasiques issues, à l'origine, de formations tissulaires dont la réceptivité aux hormones génitales est totalement différente.

CHAPITRE II

# Les souches cellulaires HeLa et K. B.

Nous avons utilisé, pour notre expérimentation, les deux souches HeLa et K.B.

Le choix de la souche HeLa est dû en grande partie au fait que cette lignée provient d'un cancer épidermoïde de la sphère génitale de la Femme. Par ailleurs, cette souche est depuis longtemps adaptée à la culture continue sur verre et présente, malgré l'existence de certaines variations, une stabilité morphologique et physiologique qui permet son utilisation dans des recherches expérimentales.

Le choix de la souche K.B. a été déterminé par les nombreux liens communs qui l'unissent à la lignée HeLa. La souche K.B. est en effet d'origine humaine, elle provient également d'un épithélioma épidermoïde et se prête de la même façon à la culture continue sur verre en conservant une stabilité rigoureuse.

Un point cependant oppose nettement ces deux souches et met en relief l'intérêt de leur étude comparative : la souche HeLa provient d'un épithélioma du col utérin, c'est-à-dire d'un territoire normalement soumis à l'action des hormones génitales : la souche K.B., au contraire, provient d'un épithélioma du plancher buccal,

c'est-à-dire d'une région de l'organisme très peu soumise à l'action des hormones sexuelles.

Cette dualité d'origine, et plus précisément de réceptivité vis-à-vis des hormones génitales, nous montre que ces deux types cellulaires sont particulièrement adaptés à l'étude des activités hormonales *in vitro*.

Nous étudierons, dans ce premier chapitre, les principaux caractères généraux de ces deux souches et nous envisagerons successivement :

— leur origine et leur adaptation *in vitro* ;
— leur morphologie : morphologie des cellules et morphologie des cultures ;
— leurs caractères histochimiques ;
— leurs caractères physiologiques ;
— leur mode de croissance selon les conditions expérimentales utilisées ;
— nous nous attacherons enfin au délicat problème de la stabilité cellulaire sur lequel repose toute la valeur de nos résultats et de leur interprétation.

*
**

## LA SOUCHE HeLa DE GEY

### I. — Origine

C'est à Gey, Coffman et Kubicek (1952) que l'on doit la création de cette souche de cancer épidermoïde. Ces auteurs prélevaient sur des cols utérins humains néoplasiques deux explants : l'un au niveau de l'épithélioma, l'autre dans la zone normale de l'épithélium cervical. Ils étudiaient ensuite, *in vitro*, les possibilités de développement de ces formations. En général, les cultures dégénéraient rapidement et c'est exceptionnellement qu'une souche de cancer épidermoïde, qui avait été explantée le 8 février 1951 par Kubicek, put être établie en culture continue. Le milieu permettant son

entretien en roller-tube était alors composé de plasma de Poulet, d'extrait embryonnaire bovin et de sérum humain placentaire. C'est au Congrès de l'American Association for Cancer Research que Gey, Coffman et Kubicek publièrent pour la première fois en avril 1952 leurs recherches sur cette souche particulière. Plus tard, en 1954, celle-ci prenait rang sous le nom de lignée HeLa, initiales de la malade qui procédait la tumeur primitive. Très rapidement, la grande résistance de cette lignée se révélait et la facilité avec laquelle on pouvait la cultiver sur verre en fit un *remarquable instrument de travail.*

## II. — Morphologie

Nous envisagerons en premier lieu la morphologie des cellules HeLa proprement dites et nous étudierons ensuite la structure habituelle des cultures de la souche.

### 1° *Morphologie des cellules HeLa*

La cellule HeLa apparaît dans la plupart des cas sous la forme d'un élément polygonal aplati, dont le diamètre se situe en moyenne autour de 25 μ. Sa taille cependant est très variable, et à côté de petits éléments de 10 μ, on peut rencontrer des cellules géantes de 50 et même 80 μ de diamètre (fig. 1, A).

L'aspect épithélial que nous venons de décrire est celui de la cellule faisant partie d'une colonie riche. Lorsque la densité cellulaire est faible, la cellule est allongée et prend même une allure fibroblastique si elle est totalement isolée.

a) *Le cytoplasme.* — Il est granuleux et présente toujours une zone juxta-nucléaire en croissant colorée fortement par l'éosine et bien distincte d'une région périphérique moins chromatophile.

Le cytoplasme émet vers les cellules voisines des prolongements dont la nature est encore discutée. Leighton et Kline (1954) pensent qu'il s'agit plus de filaments d'union que de véritables ponts intercellulaires.

Un chondriome a été observé par Dalton, Eagle et Felix (1956), et ces auteurs ont également décrit des vésicules qu'ils assimilent à un vacuome.

Ajoutons que le cytoplasme ne fait jamais l'objet de différenciation particulière.

b) *Le noyau.* — Toujours très nettement limité et d'une densité optique remarquablement constante dans les cultures jeunes, le noyau accompagne les variations de taille de la cellule. S'il atteint en moyenne 15 µ de diamètre, sa taille peut descendre à 5 µ, mais peut atteindre 30 et même 40 µ. Sa forme est le plus souvent régulière, arrondie ou ovalaire ; cependant, les enclaves qui incisent parfois la membrane nucléaire ne sont pas toujours l'indice d'une division indirecte, mais plutôt d'une activité motrice du noyau, d'après les observations des cellules à l'état vivant (Leone, Hsu et Pomerat, 1955). Ces auteurs ont en effet remarqué des mouvements de rotation, de ballonnement, d'étranglement du noyau qui se produisent chez de nombreuses cellules en repos et seraient vraisemblablement l'indice d'une grande activité métabolique.

La chromatine est très claire, très finement granuleuse, laissant la place à de gros nucléoles. On rencontre en général deux à trois nucléoles, parfois plus, dont la taille varie de 1 à 2 µ à quelques µ. Les plus gros sont d'aspect vacuolaire.

Récemment, on a recherché l'existence d'une chromatine de Barr dans les noyaux des cellules tumorales dans le but de déterminer le sexe des néoplasmes et de choisir ainsi un traitement endocrinien approprié (Montenegro-Ortiz et Silvia-Inzunza, 1958). Cette détermination s'est avérée difficile à préciser : ainsi Orsi

et Ritter (1958), qui avaient réussi à déterminer le sexe chromatinien dans 64 % des noyaux d'une culture de carcinome mammaire humain, n'ont jamais trouvé, par contre, d'aspect interprétable dans les cellules HeLa. Dwitt et collaborateurs (1959), qui ont étudié douze lignées tumorales dont la souche HeLa, ainsi que Miles (1959) ont abouti au même échec.

### 2° *Morphologie des cultures*

A l'état vivant, et examinée directement à travers la paroi du verre, la souche se présente, suivant son âge, sous deux aspects. Jeune, elle est constituée d'îlots faits de cellules largement étalées ou allongées. Au contraire, la culture âgée se caractérise par une nappe épithéliale unicellulaire, rarement discontinue, où les cellules, étroitement tassées les unes contre les autres, dessinent, par leurs contours, une mosaïque régulière (fig. 2, A).

Cet aspect régulier des cultures permet très vite, lorsqu'il est perturbé, d'apprécier une souffrance cellulaire ou l'apparition d'éléments atypiques. Nous reviendrons ultérieurement sur ce point.

## III. — Caractères histochimiques

L'histochimie de la cellule HeLa a été plus particulièrement étudiée par David (1958) ; et Bimes, Planel et David (1959). C'est ainsi que l'on a pu mettre en évidence :

### 1° *Les composés lipidiques*

Ils sont facilement colorés par les Soudans (noir B et IV), mais ne sont ni réfringents, ni plasmales positifs, ni Ashbel et Seligman positifs. Ces lipides se présentent sous la forme de vacuoles périnucléaires dont le nombre et l'importance augmentent en fonction de l'âge des cultures. L'abondance de ces gouttelettes li-

pidiques serait en rapport avec la composition du milieu (Jacquez et Barry, 1951) et l'existence de phénomènes chimiques dégénératifs apparaissant dans les cultures vieilles et traduisant la rupture des cénapses lipoprotéiniques.

### 2° *Les composés glucidiques*

Des composés P.A.S. positifs, peu abondants, déjà signalés par Van Duijn (1955), sont localisés dans la partie périnucléaire du cytoplasme. Ils ne se colorent plus après digestion par l'analyse salivaire.

### 3° *Les acides nucléiques*

L'acide désoxyribonucléique a été étudié dans le noyau après réaction de Feulgen par Boyer et collaborateurs (1957), et David a montré l'abondance de l'acide ribonucléique dans le cytoplasme où sa répartition est uniforme.

### 4° *Les phosphatases*

La phosphatase acide a été mise en évidence par Green et Verney (1956) sur des cultures de sept jours par la réaction de Rutenberg et Séligman. Cet enzyme est localisé dans la zone périnucléaire et sa richesse augmente dans les éléments sénescents.

David a d'autre part montré par la réaction de Gomori et Takamatsu que l'activité phosphatasique alcaline était très importante dans toutes les cellules, comme le montre le noircissement total du corps cellulaire par cette réaction. Cette activité phosphatasique diminue avec le vieillissement de la culture.

## IV. — Caractères physiologiques

Nous insisterons plus spécialement sur trois propriétés physiologiques car elles sont responsables d'aspects morphologiques particuliers.

La première est la *phagocytose*. Elle a été décrite par Gropp et Huke (1956) en microscopie en contraste de phase. Mais comme le signale David (1958), cette phagocytose peut s'observer également sur des préparations fixées et colorées. Elle se produit à l'égard de particules en suspension dans le milieu, qu'il s'agisse de pigments hémoglobiniques souillant le sérum ou de particules de verre ou de coton. Dans les cultures âgées, la phagocytose devient importante et intéresse plus spécialement les éléments cellulaires dégénérés. Ce dernier phénomène correspond peut-être, comme l'a pensé Painter (1953), à un essai de récupération des matériaux nucléaires.

Une deuxième propriété est la *pinocytose* (Rose, 1955, 1956, 1957 1, 1957 2). Beaucoup moins fréquente que la phagocytose, la pinocytose, comme l'a décrite Lewis (1931), consiste en la présence, dans la cellule, de petites gouttelettes liquides qui progressent à travers le cytoplasme en diminuant de volume pour disparaître finalement contre la membrane nucléaire. Le but de ce phénomène n'est pas clairement élucidé, mais l'abondance des cellules en pinocytose dans des milieux contenant du sérum de malades porteurs d'adénocarcinome avait fait proposer ces faits comme un test diagnostic du cancer (Rose, 1958).

Enfin, Gey, Bang et Gey (1955) ont montré que les prolongements rameux, aperçus sur les cellules isolées à l'état fixé, correspondent à des pseudopodes qui confèrent un certain degré d'*amiboïsme* à la cellule vivante. Cette activité motrice persiste pendant plusieurs heures après l'exérèse du noyau (Goldstein et collaborateurs, 1960). Rose (1960) a montré d'autre part la possibilité, entre deux cellules voisines, d'échanges cytoplasmiques et notamment d'échanges de mitochondries. Un tel phénomène n'a pas été observé sur des éléments normaux en culture ; il serait peut-être spécifique des cellules malignes.

Il faut d'autre part souligner l'importance d'une propriété physiologique particulière de la cellule HeLa due à son adaptation à la culture *in vitro*, c'est-à-dire la tendance à adhérer fortement, sans support particulier, aux parois de verre. Cette propriété, qui n'est pas spécifique de la souche HeLa, est ici très développée. L'*adhérence au verre*, largement utilisée dans le choix des techniques de culture, dépend non seulement des cellules elles-mêmes, mais aussi de facteurs externes :

1° La présence de sérum dans les milieux de culture semble exercer, en dehors d'un apport nutritif, un rôle particulier sur l'adhérence des cellules HeLa (Fisher, Puck et Sato, 1958). L'absence de sérum provoque en effet la suspension des cellules dans les milieux (Evans et ses collaborateurs, 1956 [1], 1956 [2] ; Mac Quilkin, Evans et Earle, 1957 ; Pumper, 1958 ; Katsuta et ses collaborateurs, 1960).

2° Rappaport, Poole et Rappaport (1960) ont montré d'autre part le rôle de la nature du verre utilisé. Plus précisément, les verres dont la teneur en sodium est forte permettent une meilleure adhérence. Cet effet peut être obtenu sur des verres pauvres en sodium par lavage des parois à la soude sous contrôle colorimétrique.

3° Enfin, Worden (1961) a montré que la charge électrique des éléments mis en présence joue également un rôle important dans ce mécanisme de la fixation cellulaire.

## V. — Croissance

### 1° *Division cellulaire*

Elle se fait selon les deux processus classiques :

— la *division directe* s'effectue essentiellement par bourgeonnement. Les noyaux prennent alors l'aspect de trèfles à plusieurs feuilles, avec de profondes incisures

dirigées vers le centre. Secondairement, les fragments nucléaires s'isolent, mais restent agglutinés au centre du cytoplasme de la cellule originelle. La plasmodiérèse succédera souvent très tardivement à cette division nucléaire ;

— la *division indirecte* est le mode de division le plus fréquent. A côté des mitoses typiques, on remarque un assez grand nombre de mitoses atypiques, pluripolaires, ou présentant des anomalies mitotiques telles que la présence de chromosomes retards. L'observation de plaques équatoriales a permis à Hsu (1954) de préciser le nombre de chromosomes : il varie largement de 70 à 130 comme valeurs extrêmes, avec un nombre modal situé entre 80 et 90 chromosomes selon les cultures. Plus récemment, Chu et Giles (1958) ont étudié le caryotype de plusieurs clones dérivés du HeLa où le nombre modal le plus fréquemment retrouvé est celui de 78 chromosomes. La cellule HeLa serait donc hypertriploïde.

La microcinématographie en contraste de phase a permis à Hsu et Moorhead (1965 1, 1965 2) d'étudier sur la cellule vivante la durée des phases successives de la mitose. La division complète s'effectuerait en quatre-vingts à cent soixante minutes et la métaphase serait la période la plus longue, ce qui correspond à nos observations de cultures fixées où l'abondance relative de cette phase est nette. Il s'agirait là d'un caractère d'ordre général, retrouvé chez toutes les cellules cancéreuses comme l'ont montré Timonen, Therman et Oksala (1956), qui signalent l'augmentation constante de l'index prophasique (rapport du nombre de métaphases sur le nombre de prophases) dans tous les éléments néoplasiques.

### 2° *Croissance des cultures*

a) *Caractères généraux.*

La croissance des cellules HeLa a fait l'objet de divers travaux. D'après Lépine et collaborateurs (1956).

la croissance, exprimée d'après le nombre des cellules dans les cultures en fonction du temps, se traduit graphiquement, en coordonnées semi-logarithmiques, par une droite de pente élevée. Des recherches plus précises ont permis à TAKANO, YAMADA et YAGINUMA (1956) de montrer, par la méthode des comptages cellulaires à l'hématimètre, que la courbe de croissance passe par deux phases : une phase logarythmique traînante où le taux de croissance est faible, et une phase logarythmique active où le taux de croissance est beaucoup plus élevé. La première phase est brève et ne dure que douze heures, les dix jours suivants correspondent à la phase active. Si l'on poursuit la culture sans renouveler le milieu, la courbe de croissance logarythmique s'exprime, pratiquement, par un plateau.

L'index cinétique a également été calculé en fonction du temps par HSU (1955) ; il augmente au début, devient maximum vers le troisième jour, diminue ensuite à partir du cinquième. Ces résultats ont été confirmés par YAMADA et TAKANO (1956), qui observent une ascension de l'index pendant les deux premiers jours, une stabilisation pendant les trois jours suivants, puis une chute rapide jusqu'au onzième jour.

D'autres auteurs ont étudié le rythme de reproduction et la croissance des cellules HeLa elles-mêmes. En se basant sur des numérations cellulaires, TAKANO et collaborateurs (1956) considèrent que la durée moyenne d'une interphase est de trente-six heures trente minutes. SHU (1960) donne lui-même le chiffre de trente heures trente minutes en se basant, sous contrôle microcinématographique en chambre de Sykes-Moore, sur le temps écoulé entre l'anaphase d'une cellule et celle de la cellule fille. Par ailleurs, SANDRITTER et collaborateurs (1960) ont montré que la croissance d'une cellule pendant l'interphase, calculée d'après sa superficie, son poids sec, son volume, répondait à une formule mathématique précise.

b) *La vitesse de croissance des cultures dépend de nombreux facteurs et plus spécialement de facteurs métaboliques et de la richesse de l'inoculum.*
*— Les facteurs métaboliques.*

Comme l'ont montré les recherches de Eagle (1955 1) sur milieux synthétiques, les cultures HeLa ne présentent une croissance normale qu'en présence d'un certain nombre de constituants organiques.

Si l'utilisation de dipeptides ne paraît pas nécessaire (Eagle, 1955 2), la cellule HeLa demande cependant pour sa croissance la présence de treize acides aminés (Eagle, 1955 3). Parmi eux, nous trouvons les huit acides aminés indispensables à l'organisme humain : leucine, isoleucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane et valine. La cellule HeLa demande en outre cinq autres acides aminés : la cystine, la tyrosine, l'histidine, l'arginine dont le rôle a été précisé par Thomas (1959), et surtout la glutamine qui semble être l'acide aminé le plus indispensable à la cellule HeLa puisque des concentrations très élevées d'acide glutamique ne parviennent que mal à la remplacer (Eagle et collaborateurs, 1956 ; Pasieka et collaborateurs, 1958-1960). L'absence d'un seul de ces treize acides aminés dans le milieu de culture provoque l'arrêt de la croissance, la dégénérescence et la mort cellulaire (Eagle, Oyama et Levy, 1955).

Certaines vitamines sont également nécessaires à la croissance des cellules HeLa, elles sont au nombre de sept : choline, acide folique, nicotinamide, acide panthothénique, pyridoxal, riboflavine et thiamine (Eagle, 1955 4, 1956 1). Ce sont les seules cellules cancéreuses humaines qui peuvent se cultiver *in vitro* en l'absence de Myomésoïnositol (Eagle et collaborateurs, 1956-1957).

Enfin, il faut ajouter au milieu de culture du glucose et des sels minéraux : chlorure de sodium, de po-

tassium, de calcium et de magnésium ; phosphate monosodique et bicarbonate de soude (Eagle, 1956 2).

Cependant, si un tel milieu purement synthétique peut faire vivre des cellules HeLa, il ne permet leur culture prolongée qu'après addition de 5 à 10 % de sérum dialysé.

Ce sérum dialysé ne suffit d'ailleurs plus dès que l'on veut cultiver de très faibles inocula ou des cellules isolées. Il faut alors ajouter sept autres acides aminés : alanine, acide aspartique, acide glutamique, asparagine, glycine, proline et surtout sérine (Lockart et Eagle, 1959). D'ailleurs, Sato, Fisher et Puck (1957), qui ont étudié les divers facteurs qui modifient les besoins en molécules indispensables des cellules HeLa, estiment que cette grande variabilité d'états métaboliques dépend peut-être des souches utilisées.

Devant ces difficultés de culture dans les milieux synthétiques, on préfère, dans la pratique courante, utiliser un milieu contenant des sels, du glucose et où les autres éléments sont globalement apportés par une source naturelle telle que plasma, sérum, liquide d'ascite, extraits embryonnaires. Des variations de concentration de ces substances entraînent, d'ailleurs, des modifications de la vitesse de croissance (Moore, Sabachewsky et Toolan, 1955).

— *La richesse de l'inoculum.*

En utilisant la méthode de comptage cellulaire mise au point par Sanford et collaborateurs (1951), Pace et Layon (1960) ont étudié l'influence de la densité cellulaire de l'inoculum sur le rythme de prolifération de la culture qui en résulte. Une densité cellulaire initiale de 4 000 à 15 000 cellules par millilitre est minimale pour obtenir une prolifération. Avec 35 000 à 120 000 cellules au départ, la croissance est encore lente et la richesse cellulaire maximale des cultures n'est atteinte qu'au bout de trois semaines. Pace et Layon

estiment que la densité optimale est de 280 000 cellules par millilitre. Au contraire, si l'on utilise une densité supérieure, les phénomènes dégénératifs l'emportent sur les phénomènes de croissance. Nous avons nous-même constaté qu'une concentration initiale de l'ordre de 200 000 à 300 000 cellules par millilitre permet d'entrer directement en phase de croissance active.

### 3° *Le vieillissement des cultures*

Quelques heures après la mise en culture, une certaine proportion d'éléments cellulaires fait l'objet de phénomènes dégénératifs. Ainsi que nous avons pu l'observer, ces derniers répondent à deux schémas distincts.

La plupart du temps, les phénomènes dégénératifs se traduisent par une rétraction de la cellule. Celle-ci perd progressivement ses prolongements, s'arrondit, tandis que le cytoplasme devient très chromatophile et présente un aspect densifié. Le noyau se pycnose parallèlement et précocement. Les cellules vont en grande partie se mobiliser dans le milieu. D'autres, inversement, vont rester dans la culture où elles seront phagocytées par les éléments cellulaires voisins. Ces phénomènes de phagocytose, décelables dès le premier jour, deviennent très fréquents si l'on poursuit la culture sans renouveler le milieu.

Un autre mode de dégénérescence semble intéresser d'abord le cytoplasme. Celui-ci tend à se fragmenter en constituant des masses piriformes disposées de façon radiaire autour du noyau, qui conserve pendant un certain temps un aspect normal.

C'est en se basant sur la précocité de ces phénomènes dégénératifs, observés même avec des inocula appropriés, que nous avons fixé le temps d'arrêt des cultures expérimentales à quarante-huit heures de l'ensemencement, de façon à nous trouver dans la période la plus favorable de la croissance cellulaire et avant qu'aucun signe de souffrance ne se manifeste.

## VI. — Stabilité

La souche HeLa ayant été isolée depuis un certain nombre d'années, peut-on affirmer que le matériel cultivé actuellement est encore identique à celui que Gey et ses collaborateurs ont isolé pour la première fois en 1952 ? Cette question pose le problème fondamental de la stabilité du matériel cellulaire sur lequel a porté notre expérimentation et des arguments contraires peuvent y répondre.

### 1° *La souche HeLa présente en effet des caractères stables*

*a)* Les cellules HeLa ont été fréquemment cultivées dans des milieux de compositions sensiblement différentes. Malgré ces conditions de culture variables, elles présentent en général la même morphologie et donnent naissance à des lames épithéliales d'aspect caractéristique.

*b)* Si le nombre des chromosomes des cellules HeLa varie dans des limites assez larges, le nombre modal, par contre, établi par différents auteurs, paraît assez constant et oscille autour de soixante-dix-huit (Hsu, 1954 ; Chu et Giles, 1958 ; Puck, 1958 1).

*c)* Par ailleurs, de nombreuses expériences permettent d'affirmer que les cellules HeLa ont toujours conservé, malgré l'ancienneté de leur isolement, non seulement leur caractère épithéliomateux en général, mais encore les caractères particuliers qui définissent la souche. Cette notion résulte, notamment, des expériences de transplantation à l'animal.

On sait, en effet, depuis les travaux de Toolan (1951 1, 1951 2, 1952, 1953 1, 1953 2), qu'il est possible de greffer des cellules HeLa, en suspension dans du Ringer tamponné, au Rat cortisoné et d'obtenir, au

point d'inoculation, l'apparition de tumeurs comparables histologiquement à l'épithélioma utérin à partir duquel la souche a été isolée.

Ces recherches fondamentales ont été reprises secondairement par GEY (1954) qui a implanté des cellules HeLa dans la chambre antérieure de l'œil du Cobaye et a obtenu des proliférations cellulaires d'aspect tumoral. Cet auteur devait en outre démontrer qu'après quatre mois de développement *in vivo*, les cellules ainsi greffées redonnent naissance, lorsqu'elles sont remises en culture, à des éléments identiques à ceux de la souche cellulaire initiale.

Des résultats comparables ont été obtenus plus récemment après inoculation de cellules HeLa dans le cerveau de Rats irradiés et cortisonés par SCOTTI et ses collaborateurs (1960).

Cette tendance à redonner naissance aux formations épithéliomateuses caractéristiques des lésions initiales peut s'observer également *in vitro*. En effet, cultivant des cellules HeLa sur éponge de cellulose. LEIGHTON (1952-1954) a constaté qu'elles se développent sur ce substrat en reconstituant des formations trabéculaires typiques. De même WOLFF et WOLFF (1958-1959), en cultivant côte à côte des cellules HeLa et des organes embryonnaires de Poulet, ont montré que les cellules épithéliomateuses envahissent les ébauches organiques et notamment le mésonéphros en y reconstituant des amas épithélioïdes.

Nous avons nous-même repris les expériences de TOOLAN et injecté une suspension de cellules HeLa à dix Rats mâles pesant 80 grammes en moyenne et recevant quatre injections de 2 milligrammes de cortisone pour 100 grammes de poids corporel. Après quinze jours environ, les tumeurs apparues au point d'inoculation, dans la région inguinale, étaient formées par des travées néoplasiques dont l'aspect était identique aux lésions d'un épithélioma malpighien.

Ce remarquable caractère de stabilité de la souche, que vient de souligner le rappel de ces diverses données expérimentales, n'est d'ailleurs pas spécifique de la souche HeLa. D'autres souches carcinomateuses présentent le même comportement et, dès 1939, Fischer et Davidsohn avaient montré que les cellules de l'adénocarcinome d'Ehrlich se comportent, après douze ans de culture *in vitro*, comme des cellules tumorales si elles sont implantées à l'animal. De même, Moore, Sabeschewsky et Toolan (1955) ont démontré que différentes lignées cancéreuses, adaptées également à la culture continue et réinoculées périodiquement à l'animal, redonnent naissance à des tumeurs d'aspect toujours identique. Les caractères de chaque néoplasie sembleraient donc capables de se conserver indéfiniment.

### 2° *La souche HeLa présente également des caractères instables*

Ainsi, certains faits amènent à penser que les caractères morphologiques ou physiologiques de la souche HeLa peuvent faire l'objet de modifications. Nous citerons seulement quelques exemples à l'appui de cette notion.

*a)* Au cours de notre expérimentation, nous avons pu constater que les cellules HeLa présentent parfois une morphologie différente de celle observée habituellement. Les cultures ainsi obtenues, d'aspect « atypique », sont constituées par des cellules globuleuses dont le cytoplasme, peu abondant, est très chromatophile et entoure un noyau rond, à chromatine dense. La taille des éléments cellulaires est très uniforme et la caractéristique essentielle de ces cultures est le rassemblement des cellules en amas espacés, constitués de quatre à cinq couches superposées. Entre ces amas, quelques cellules isolées prennent un aspect fibroblastique. Par

ailleurs, tous ces éléments ont une tendance accrue à se mobiliser dans le milieu de culture.

Ces modifications morphologiques, apparues spontanément, se sont révélées réversibles, les conditions du retour à la normale demeurant aussi inexpliquées que celles qui avaient déterminé cette variation.

*b)* Des modifications de caractères peuvent être également observées lors des expériences de cloning. En effet, il est avantageux, dans la recherche d'une hétérogénéité de lignée, de pouvoir comparer à l'évolution de cette lignée, l'évolution d'une clone cellulaire. Wildy et Stoker (1958) ont notamment énoncé une méthode de dilution appliquable aux souches suffisamment adaptées aux modalités de culture (Stulberg et Berman, 1958), en particulier à la souche HeLa.

Cependant, la méthode de cloning la plus utile à nos yeux est celle mise au point par Puck et Marcus (1955) et qui s'inspire des idées de Rous et Jones (1916). Ces auteurs ont adopté les techniques bactériologiques à la culture de cellules de mammifères, et des perfectionnements successifs (Puck, 1957 ; Puck, Cieciura et Fisher, 1957) leur ont permis d'établir une méthode de cloning dont la réussite est de 100 %. Les auteurs utilisent des boîtes de Pétri dont le fond est recouvert d'un milieu nutritif parfaitement équilibré et rendu semi-solide par l'agar-agar, à la surface duquel on dépose une suspension de cellules HeLa dont la concentration est extrêmement faible. Chaque cellule va donner naissance à une colonie et il est ainsi facile d'examiner côte à côte l'évolution d'un nombre important de clones établis par les lois du hasard. On peut alors constater, dans le cas de la souche HeLa, que ces colonies sont souvent dissemblables. Elles sont en effet plus ou moins volumineuses et les cellules qui les constituent peuvent avoir un aspect fibroblastique, épithélial ou intermédiaire. Leurs rythmes de croissance sont éga-

lement variables ainsi que leur sensibilité à la présence ou à l'absence de certains facteurs métaboliques. Cette diversité d'aspect et de comportement des divers clones en présence fait penser à une hétérogénéité cellulaire de la culture stock ou à l'instabilité plus ou moins grande de certains caractères cellulaires.

*c)* Un autre exemple de variabilité nous est fourni par les recherches de YAMADA (1959). Après avoir isolé une lignée de base, cultivée en milieu standard avec transferts hebdomadaires et où la stabilité morphologique se maintenait rigoureusement malgré plus de cent dix transferts, cet auteur soumet cette même lignée à une culture continue sans changement de milieu. Dans ces conditions, la plupart des cellules, d'aspect épithélial typique, dégénèrent ou se développent en suspension dans le milieu. Cependant, après soixante jours de culture, de petites colonies apparaissent fixées à la paroi de verre, dans lesquelles les cellules ont un aspect nettement fibroblastique. Ces cellules, après repiquage, donnent naissance à une nouvelle lignée constituée d'éléments présentant toujours un aspect fibroblastique et dont le rythme de croissance et l'activité glycolytique sont également différents de ceux observés dans la lignée originelle. La modification de caractère est donc ici à la fois d'ordre morphologique et physiologique, et l'auteur signale qu'elle s'est maintenue au cours de cinquante transferts.

Une variation d'ordre également physiologique a été observée par KATSUTA et collaborateurs (1960), elle concerne la propriété qu'ont les cellules HeLa d'adhérer au verre. Nous avons déjà vu que cette propriété est due essentiellement à la présence des protéines du sérum dans les milieux de culture. Partant de ces données, les auteurs ont cultivé des cellules HeLa dans un milieu appauvri progressivement en sérum, la pression osmotique étant toutefois maintenue par un apport de

polyvinyl-pyrrolidone inactive sur les cultures normales. Les cellules, dans ces conditions, perdent effectivement leur propriété d'adhérence au verre et se développent en suspension dans leur milieu. TAKAOKA et ses collaborateurs (1960) devaient cependant constater qu'en poursuivant l'expérience, certaines récupèrent progressivement leur propriété originelle et se fixent de nouveau au verre malgré l'absence totale de sérum dans le milieu de culture. Nous voyons donc ici se modifier un seul caractère physiologique qui témoigne de la faculté pour certaines cellules d'une adaptation progressive tendant à rétablir leur mode de vie antérieure.

*d)* Les cellules HeLa, enfin, peuvent faire l'objet de modifications de caractères qui, paraissant définitives et héréditaires, peuvent être considérées comme le résultat de mutations.

— On sait ainsi que PUCK et FISHER (1956) ont pu isoler par cloning, à partir d'un stock de cellules HeLa, deux sous-lignées $S_1$ et $S_3$. Celles-ci paraissent bien correspondre à des mutants car elles conservent une morphologie constante pour un milieu déterminé, leur nombre chromosomique modal est constant et égal à soixante-dix-huit (CHU et GILES, 1958). Les deux lignées diffèrent cependant l'une de l'autre par leur formule chromosomique et surtout par leur vitesse de croissance dans un milieu enrichi en sérum humain (FISHER, PUCK et SATO, 1959).

— Le mutant S.N.D.V. est aussi nettement caractérisé par sa résistance au virus de la maladie de Newcath (CIECIURA, MARCUS et PUCK, 1957).

— Le HeLa « Variant », découvert par EAGLE, PIEZ et FLEISCHMAN (1957), a été facilement isolé par son aptitude à transformer, contrairement à la cellule HeLa normale, la phénylalanine en thyroxine.

— EAGLE (1959) considère également comme des

mutants certaines populations de cellules HeLa dont la croissance demande la présence d'acides aminés particuliers (Lockhart et Eagle, 1959).

— Enfin, récemment, Chang (1960) caractérise des mutants de cette souche par leur capacité d'utiliser chacun un glucide particulier.

Ainsi, les critères morphologiques, physiologiques, caryologiques qui sont utilisés pour définir les bases de la nomenclature des souches cellulaires (Paul, 1958 ; Defendi et collaborateurs, 1960) ont permis d'établir l'existence de ces sous-lignées de mutants d'apparition spontanée.

A côté de ces sous-lignées, considérées donc comme apparues sous l'effet de mutations spontanées, Puck et Marcus (1956) ont décrit des sous-lignées $S_3$-RAI, $S_3$-REI, $S_3$-RBI, $S_3$-$R_3$, obtenues après irradiation par les rayons X (Puck et collaborateurs, 1957, 1958 [2]). Ils montrent ainsi que les cellules HeLa peuvent également faire l'objet de mutations provoquées.

### 3° *Discussion*

Les faits que nous venons de rapporter démontrent qu'à côté de certains caractères stables, la souche HeLa présente parfois une instabilité de ses caractères morphologiques et physiologiques. Quelle portée peut-on attribuer à cette constatation ? Plus précisément, peut-on penser que cette instabilité puisse influencer les résultats des expérimentations basées, comme la nôtre, sur le comportement de cette souche ? Il ne le semble pas. Il paraît en effet possible de limiter l'importance de ces variations, et plusieurs notions militent dans ce sens :

1° L'instabilité des cellules HeLa n'est souvent qu'un phénomène éphémère conduisant secondairement vers un retour aux caractères normaux :

— Ainsi, l'existence des cultures « atypiques » que

nous avons observées est transitoire, les mêmes éléments cellulaires redonnant ultérieurement naissance à des cultures d'aspect normal. De plus, quel que soit le type de culture, classique ou atypique, les résultats expérimentaux vis-à-vis des hormones génitales sont rigoureusement superposables. Les variations morphologiques observées sont donc isolées et ne s'accompagnent pas d'une variation parallèle de réactivité des cellules HeLa vis-à-vis de la stimulation hormonale.

— L'aspect fibroblastique des cultures observées par YAMADA sous certaines conditions, ainsi que leur rythme de croissance sont par deux fois retournés aux caractères originaux lorsque l'on remettait ces cellules dans des conditions de culture normales. Par contre, le caractère de la glycolyse paraît véritablement acquis. Il faut cependant remarquer, à propos des expériences des auteurs japonais, que les variations observées dans les caractères des cellules HeLa ont été non point brutales, mais progressives, correspondant à la nécessité, pour ces éléments cellulaires, de s'adapter à des conditions de vie encore plus rigoureuses que celles, déjà artificielles, auxquelles elles sont soumises *in vitro*. Ces faits montrent donc que même des modifications provoquées peuvent ultérieurement disparaître.

— De même, dans les expériences de cloning de PUCK, les colonies issues de cellules isolées et qui ont au départ un aspect et une constitution fort variables, donnent ultérieurement naissance, dans des conditions de culture normales, à des clones qui finissent par se confondre en présentant progressivement tous les caractères originels de la culture stock. Les variations observées au départ peuvent alors s'expliquer par l'isolement cellulaire, nous avons en effet déjà montré l'importance pour la croissance de la souche HeLa d'une certaine richesse d'ensemencement. D'autre part, la cellule ainsi isolée est certainement plus sensible aux fac-

teurs toxiques des sérums que peut seul éviter un milieu très riche. Ces faits ont d'ailleurs été soulignés par Fisher et Puck (1956), et Puck, Marcus et Cieciura (1956) qui arrivent à éviter totalement la diversité des clones cellulaires obtenus par la méthode de Puck en utilisant comme milieu une nappe de cellules HeLa tuées par irradiation.

2° Les phénomènes de mutation sont par contre indiscutables, mais on peut remarquer qu'ils semblent n'intéresser qu'une proportion limitée des éléments cellulaires. Il semble en effet, tout au moins avec l'emploi des techniques actuelles, que les espèces mutantes soient proportionnellement peu nombreuses par rapport à la totalité des cellules de la culture stock. Ainsi ce n'est qu'après de nombreux essais que Puck a pu isoler les sous-lignées $S_1$ et $S_3$ et les considérer comme de véritables mutants. Ajoutons, par ailleurs, qu'il n'est pas impossible de penser que certaines sous-lignées, considérées comme mutantes, ne puissent, après un laps de temps suffisamment prolongé, redonner naissance à des cultures de caractère normal.

3° L'hétérogénéité des cultures HeLa, qui paraît résulter de cette instabilité cellulaire, peut s'expliquer également par le fait que cette souche a été isolée, non pas à partir d'un seul élément cellulaire, mais à partir d'un fragment tumoral formé lui-même, très probablement, comme tout tissu néoplasique, par des éléments cellulaires pléomorphes, plus ou moins différenciés et de caryotype variable : c'est cette hétérogénéité de base dont on favorise l'extériorisation par le cloning, ou toute méthode tendant à isoler les cellules par le jeu de leur réactivités différentielles.

4° Si les cultures HeLa sont faites d'éléments morphologiquement variables, à nombre de chromosomes plus ou moins élevé, on peut cependant remarquer que

ces variations semblent limitées et paraissent s'effectuer en définitive dans un cadre assez étroit. Des recherches basées sur la richesse en A.D.N. des cellules HeLa en fournissent une preuve. Ainsi, si l'on détermine sur une culture stock, par histophotométrie, la richesse nucléaire en A.D.N., on constate qu'elle varie largement entre certaines limites suivant les cellules considérées. Si l'on isole secondairement quelques clones cellulaires, on constate qu'au bout de dix générations seulement la teneur du noyau en A.D.N. est de nouveau variable suivant les clones et suivant les cellules considérées, mais ces variations ne dépassent pas les limites observées antérieurement (Goldstein et Gallagher, 1958).

5° Il faut en outre remarquer que l'instabilité et l'hétérogénéité apparentes de la souche HeLa ne sont pas spécifiques de cette lignée cellulaire. Même dans le cas de tissus normaux, on peut faire apparaître une hétérogénéité si la culture est prolongée. C'est ainsi, notamment, que Katsuta, Takaoka et Kikuchi (1961) ont isolé, à partir de la lignée L de fibroblastes de souris, les sous-lignées $Lp_1$, $Lp_2$, $Lp_3$, $Lp_4$, caractérisées chacune par une morphologie et des besoins métaboliques particuliers. Nous retrouvons ici l'association des caractères morphologiques et physiologiques.

D'autre part, Marcus, Cieciura et Puck (1956) ont réalisé à partir de cultures cellulaires normales provenant de foie, rein, conjonctive, appendice, et en utilisant la technique de Puck, des clones cellulaires qui ne se distinguent en rien de ceux décrits pour les cellules HeLa, que l'on considère la morphologie des colonies, leur vitesse de croissance ou leur richesse en cellules géantes multinucléées.

Par ailleurs, l'hétéroploïdie n'est en rien spécifique des souches néoplasiques, et Hsu et Moorhead (1957) ont montré l'existence, dans des lignées cellulaires normales, d'une polyploïdie très marquée qui serait liée

à l'adaptation particulière de ces éléments pour la culture de tissu. Cette hypothèse semble vérifiée par les travaux de Puck, Cieciura et Robinson (1958) qui ont pu observer des cultures prolongées de cellules humaines et animales sans développement d'aneuploïdie en ajoutant de la fétuine au milieu de culture et en contrôlant strictement le pH et la température. On peut, dans ces conditions, comparer étroitement le métabolisme des cellules normales et cancéreuses.

Il faut enfin signaler que l'on a vu se cancériser *in vitro* non seulement des lignées cellulaires épithéliales normales (Moore, Southan et Sternberg, 1956), mais encore des cultures de fibroblastes humains normaux (Leighton, Kline et Orr, 1956 ; Sanford et collaborateurs, 1959). Or jamais des modifications structurales aussi fondamentales n'ont été observées dans les lignées cancéreuses.

Tous ces faits nous amènent à penser que s'il existe une certaine variabilité des caractères de la souche HeLa, on peut considérer qu'elle constitue, prise dans son ensemble, un matériel suffisamment stable pour qu'il soit possible de l'utiliser valablement dans des recherches expérimentales. C'est en nous basant sur ces données que nous avons fait porter notre travail sur la souche elle-même et non sur une lignée cellulaire préalablement isolée par cloning, ce qui n'aurait eu d'autre but que de diaphragmer notre étude.

Au contraire, cette technique nous a probablement permis de nous rapprocher davantage des éléments cellulaires dont est issue la souche et de mieux envisager, en conséquence, l'influence possible que les hormones génitales peuvent exercer sur une néoplasie cervicale humaine.

*
**

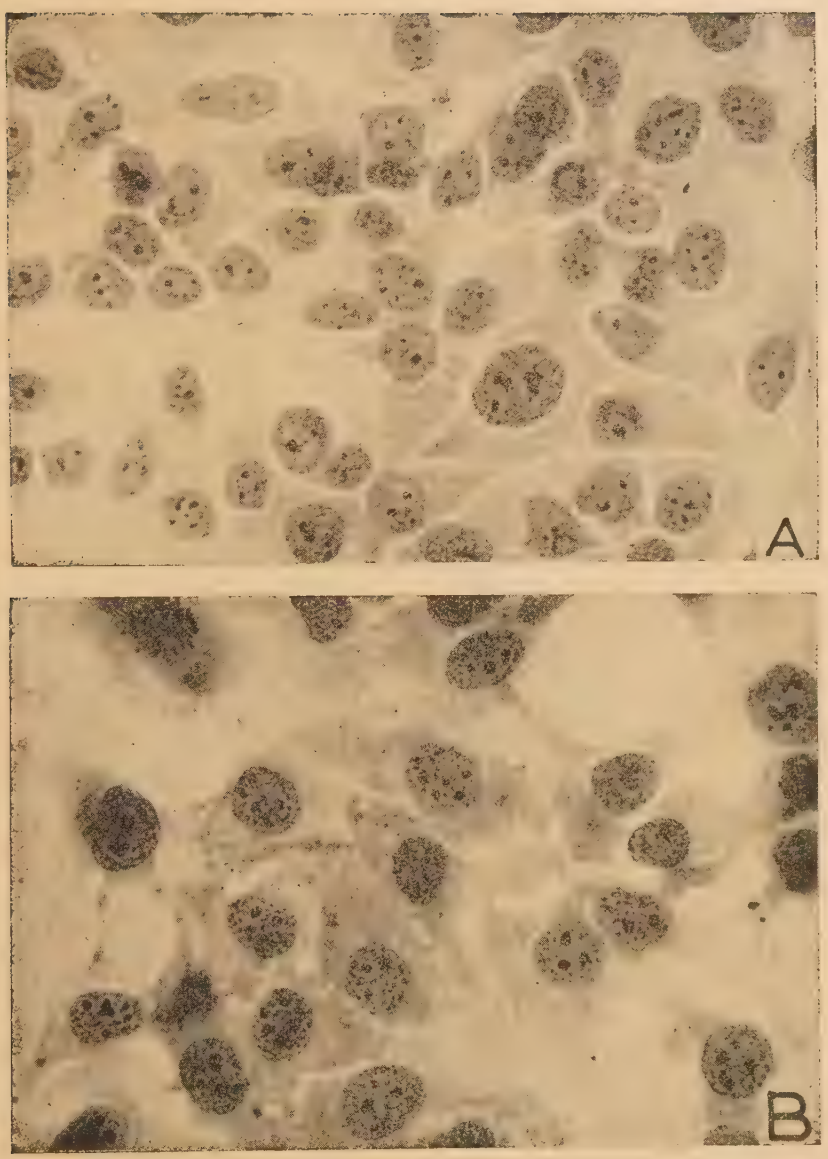


FIGURE 1.

*Aspect général des souches cellulaires tumorales*
(coloration de PAPANICOLAOU)

A : souche HeLa. — Aspect en nappe épithéliale homogène. Cellules polygonales.

B : souche K.B. — Aspect en réticulum irrégulier. Cellules rameuses.

## II. — LA SOUCHE K.B. DE EAGLE

### I. Origine

C'est à Eagle (1955) que l'on doit la création de la souche K.B. Cette souche a été isolée à partir d'un épithélium épidermoïde peu différencié du plancher buccal de la langue, apparu chez un homme de race blanche, âgé de cinquante-quatre ans.

La culture initiale a été réalisée à partir de très petits fragments tumoraux dissociés par la trypsine.

Après agitation et décantation, le surnageant a été centrifugé et le sédiment cellulaire obtenu, repris, après lavage, dans du milieu frais. C'est à partir de cet inoculum que la culture en flacons a été directement utilisée. Après stabilisation, la souche ainsi réalisée fut étudiée par Eagle en 1955 sous le nom de souche K.B.

Isolée peu de temps après la souche HeLa, la souche K.B. n'a fait l'objet que d'un petit nombre de travaux. Elle présente pourtant une homogénéité remarquable et son entretien est facile.

### II. Morphologie

#### 1° *Morphologie de la cellule K.B.*

La cellule K.B. apparaît le plus souvent sous la forme d'un élément rameux, polyédrique, aux limites cellulaires convexes, et dont la taille, remarquablement uniforme, atteint en moyenne 30 µ. Cette régularité de taille et de forme est nettement mise en évidence sur la culture de la figure 1, B.

*a)* Le *cytoplasme* est finement granuleux, condensé dans la région périnucléaire tandis qu'il s'éclaircit et devient très peu chromatophile à la périphérie et au niveau des fins prolongements cellulaires.

Nous n'avons jamais observé d'éléments intracytoplasmiques pouvant être assimilés à un chondriome ou un vacuome. Nous n'avons également jamais rencontré d'aspects différenciés de ce cytoplasme.

*b)* Le *noyau* est en général unique, nettement limité par une membrane épaisse et très chromatophile. Il est alors disposé au centre de la cellule. On peut cependant observer quelques cellules binuclées et, dans certaines conditions de culture, on voit apparaître des cellules géantes dont la partie centrale est occupée par six ou huit petits noyaux tassés les uns contre les autres. Lorsqu'il est unique, le noyau est relativement volumineux puisque sa taille moyenne se situe autour de 18 μ. La forme est la plupart du temps ovalaire, on rencontre cependant des formes bilobées ou encochées et surtout des noyaux polycycliques, bourgeonnants, parfois très nombreux dans les cultures riches.

La chromatine est uniforme, finement granuleuse, et met en relief de volumineux nucléoles, très fortement colorés, de structure compacte, identiques les uns aux autres. Ces nucléoles sont très nombreux, souvent cinq ou six dans le même noyau, mais on n'en rencontre en général que trois ou quatre, dont la taille se situe autour de 2 μ.

C'est la diversité de ces types nucléaires, qui se retrouverait d'ailleurs pour la souche HeLa, qui a conduit Lelli et ses collaborateurs (1957) à établir, pour ces deux souches, une « formule cellulaire ». Ils décrivent quinze types cellulaires différentes : huit mononucléés et sept multinucléés. Les auteurs cherchent, d'autre part, à classer ces variétés cellulaires selon leur apparition au cours du vieillissement de la culture.

Indépendamment de ce polymorphisme, on peut souligner la grande similitude d'aspect histologique des cellules HeLa et K.B.

### 2° *Morphologie des cultures*

Les cellules étant le plus souvent de forme rameuse et de taille uniforme, les cultures prennent l'aspect d'un réticulum régulier (fig. 2, C) où la lame unicellulaire est toujours discontinue. Ce caractère des cultures K.B., et le fait que les cellules de cette souche présentent un aspect moins franchement épithélial que les cellules de la souche HeLa, permettent parfois de différencier les deux lignées. Cependant, lorsque la richesse cellulaire devient excessive, les cellules K.B., étroitement collées les unes aux autres, prennent ainsi avec des contours polygonaux, l'aspect épithélial habituel.

Il est alors bien difficile, devant ces cultures riches, d'affirmer s'il s'agit de cellules HeLa ou K.B. Cette similitude a d'ailleurs été soulignée par Leighton et ses collaborateurs (1957) lors de l'étude des deux souches cultivées sur éponge de cellulose.

## III. Caractères histochimiques

La cellule K.B. n'a pas fait, à notre connaissance, l'objet d'une étude histochimique particulière. Nous avons cependant pu retrouver, sur des cultures de quarante-huit heures, des résultats sensiblement identiques à ceux rapportés dans le cas de la souche HeLa.

### 1° *Les composés lipidiques*

Dès le deuxième jour de culture, on met en évidence, dans la majorité des cellules, de petites gouttelettes lipidiques, surtout localisées dans la zone juxta-nucléaire, et dont la soudanophilie est encore faible et variable.

### 2° *Les composés glucidiques*

La réaction du P.A.S. souligne le caractère réticulé des cultures K.B. en mettant en évidence, dans la plu-

part des cellules et selon une répartition très uniforme dans le cytoplasme, un matériel finement granuleux, très peu abondant, mais présent jusque dans les plus fins prolongements cytoplasmiques. L'affinité de ces éléments pour le P.A.S. disparaît en grande partie après incubation dans l'amylase salivaire.

3° *Les acides nucléiques*

La réaction de Brachet est fortement positive pour toutes les cellules et il faut noter une très forte positivité au niveau des nucléoles.

4° *La phosphatase alcaline*

On met en évidence, par la réaction de Gomori et Takamatsu, un précipité granuleux intracytoplasmique de prédominance périnucléaire. Cette positivité est également nette au niveau des nucléoles. D'une manière générale, l'activité phosphatasique est à peu près identique pour tous les éléments cellulaires et paraît d'intensité modérée, par contre, les cellules en voie de mobilisation dans le milieu présentent une réaction de Gomori très fortement positive et sont uniformément colorées en noir.

## IV. Caractères physiologiques

La pinocytose, fréquemment décrite au niveau des cellules HeLa, ne paraît pas avoir été particulièrement étudiée dans les cellules K.B. La phagocytose, qui se retrouve dans les deux lignées, est ici plus sélective, et l'étude de cellules fixées, après des temps de culture variables, ne nous a jamais montré, en effet, d'inclusions cellulaires autres que des cellules dégénérées en voie d'autolyse. Cette activité phagocytaire se manifeste plus tardivement dans nos conditions de culture qu'elle ne le fait dans le cas de la souche HeLa ; elle est ce-

pendant évidente au troisième jour. Si l'on en juge par l'abondance, maintes fois soulignée sur les cultures fixées, des prolongements rameux des cellules, on peut penser que la souche K.B. possède des caractères d'amiboïsme plus prononcés encore que ceux de la souche HeLa. Nous n'avons toutefois jamais vérifié cette hypothèse. Il faut enfin remarquer l'identité, pour les deux types cellulaires, de la propriété fondamentale de s'attacher directement sur la paroi de verre des récipients de culture. Si aucune étude n'est venue préciser pour cette souche la nature des facteurs qui président à cette adhérence, il est probable que l'on peut considérer, ici encore, les hypothèses envisagées par de nombreux auteurs pour la lignée HeLa.

## V. La croissance

### 1° *Division cellulaire*

Elle se réalise suivant des processus semblables à ceux décrits dans le cas de la cellule HeLa. Il faut toutefois souligner l'importance des atypies mitotiques qui atteignent environ 10 % du nombre total des mitoses. Angela et ses collaborateurs (1958), signalent l'apparition d'un maximum de ces anomalies mitotiques au deuxième jour de culture en même temps qu'une nette augmentation de la consommation en oxygène.

L'importance de l'hétéroploïdie dans les deux souches HeLa et K.B. a conduit Hsu et Moorhead (1957) à comparer le degré de ploïdie de ces deux lignées carcinomateuses à celui de lignées cellulaires non cancéreuses.

Ces auteurs, en démontrant l'existence dans les cultures de cellules normales d'une hétéroploïdie également très marquée, ont émis l'hypothèse que de telles cellu-

les se développent plus facilement que les autres en culture, d'où leur sélection progressive qui maintient ainsi, *in vivo*, un taux élevé de mitoses atypiques.

### 2° *La croissance des cultures*

La croissance des cellules K.B. n'a pas été, à notre connaissance, aussi étudiée que celle des cellules HeLa. Seul, Eagle (1955) a signalé que le rythme de la mitose était sensiblement identique, chaque cellule se divisant environ toutes les trente heures.

Cependant les cultures témoins que nous avons utilisées pour étudier la croissance des cellules K.B. dans nos conditions expérimentales, mettent en évidence des divergences nettes de comportement vis-à-vis des cellules HeLa. D'une part, l'importance de la concentration cellulaire d'ensemencement peut varier dans des limites larges sans affecter le rythme de croissance qui entre d'emblée, même pour de faibles inocula, dans une phase de croissance active, sans phase traînante préalable. D'autre part, les phénomènes dégénératifs sont beaucoup plus lents à apparaître et sont encore très faibles au deuxième jour de culture, en comparaison de ceux rencontrés au bout de ce même temps dans les cultures HeLa.

Ces deux points tendent à expliquer le fait qu'avec des ensemencements de départ équivalents, la croissance des cellules K.B. soit franchement plus importante que celle des cellules HeLa. D'ailleurs, les travaux récents de Smith, Lummis et Grady (1960) apportent des précisions intéressantes sur l'activité proliféatrice des cellules K.B. Ces auteurs ont utilisé le milieu de base décrit par Eagle et, en accord avec lui, estiment à vingt-quatre à trente heures le temps de génération moyen des cellules K.B. Cependant, en se plaçant dans des conditions optimales de croissance et notamment en utilisant un faible inoculum d'ensemencement et un mi-

lieu fréquemment renouvelé, ils ont abaissé ce temps de génération à un minimum de quinze heures.

Nous avons d'autre part régulièrement constaté que l'index cinétique de la souche K.B. était plus faible que celui de la souche HeLa. Il varie ainsi de 1,1 à 1,2 pour les cellules K.B. et de 1,8 à 2,3 pour les cellules HeLa.

Ces résultats apparemment contradictoires peuvent s'expliquer par un rapport entre la durée de la mitose et celle de l'interphase beaucoup plus petit dans le cas de la lignée K.B.

Quoi qu'il en soit, nous avons pu également choisir le même temps d'arrêt des cultures expérimentales, c'est-à-dire quarante-huit heures. Cette période nous permettant d'éviter, ainsi, pour les deux souches, tout phénomène d'interaction plus ou moins gênant sur la phase de croissance étudiée.

## V. Stabilité

Bien que ce problème ait été très peu étudié, il semble que la souche K.B. puisse être considérée comme un matériel cellulaire de caractère stable, et plusieurs arguments le démontrent :

— Les cellules K.B. conservent en effet leur nature de cellules carcinomateuses lorsqu'elles sont injectées à l'animal. Inoculées dans le cerveau de Rats irradiés et traités à la cortisone, les cellules K.B. donnent ainsi naissance à des tumeurs dont la structure histologique correspond à celle dont est issue la souche elle-même (Scotti et collaborateurs, 1960).

— Les cellules K.B., cultivées en présence d'organes embryonnaires de Poulet, donnent naissance à des formations trabéculaires de caractère épithéliomateux (Wolff et Wolff, 1958-1959).

— Aucun mutant n'a été décrit jusqu'à présent, et Lockhart et Eagle (1959) n'ont pu observer de dif-

férences entre de nombreux clones isolés à partir de cette souche.

— Nous avons, pour notre part, pu constater que la souche K.B. présentait, tout au long de nos recherches, une remarquable stabilité du point de vue morphologique, et nous n'avons, en particulier, jamais observé les aspects atypiques rencontrés pour la souche HeLa.

⁂

Cette longue étude des deux souches cellulaires, sur lesquelles nous avons expérimenté, peut paraître exagérée dans ce travail. En réalité, nous avons été conduit à préciser tous les caractères de ces cellules néoplasiques pour montrer que leur isolement total en culture ne détermine pas, dans leur comportement, de remaniements assez profonds pour que l'on puisse vraiment distinguer leurs réactivités de celles des cellules en place dans le tissu cancéreux.

De nombreux auteurs ont en effet attiré l'attention sur la création des souches cellulaires en les critiquant sur deux points. D'une part, ils pensent que la cellule isolée, si elle arrive à subsister dans cet état, a dû s'adapter à une vie autonome qui a modifié totalement ses caractères pour la rapprocher du mode de vie de l'être unicellulaire. D'autre part, et nous l'avons longuement envisagé, la critique de la stabilité cellulaire de ces souches, qui a entraîné la pratique du cloning, serait lourde de conséquences si nous n'avions montré qu'elle ne peut se justifier ici.

C'est donc le souci constant de la valeur de nos résultats, de leur adaptation et de leur application sur les cellules *in vivo*, qui nous a amené à développer ce chapitre dont les conclusions paraissent favorables et justifient, dans cette étude de l'action directe des hormones génitales, l'emploi du matériel cellulaire que représentent les deux souches HeLa et K.B.

CHAPITRE III

# Les techniques de culture

Nous avons appliqué aux deux souches cellulaires précédemment décrites, des méthodes de culture rigoureusement identiques afin d'éviter des sources d'erreurs dues aux techniques expérimentales lors de l'étude comparative des résultats.

Nous envisagerons successivement :

1° Les milieux utilisés, en précisant la composition :
   — du milieu de base, employé pour la culture stock ;
   — du milieu expérimental, contenant les hormones.

2° Les techniques de culture proprement dites, en étudiant :
   — les techniques d'entretien des stocks cellulaires ;
   — les techniques particulières adaptées à nos recherches.

3° Les méthodes d'appréciation de la croissance, à savoir :
   — la numération des cellules sur les lamelles de culture ;
   — les méthodes secondairement utilisées pour tester l'exactitude de la première.

## I. Les milieux

### 1° *Le milieu de culture du stock cellulaire*

Il est essentiellement constitué, à la base, par la solution physiologique de Hanks. Cette solution contient, en effet, de nombreux sels, dont les uns : chlorure de sodium et chlorure de potassium, confèrent à la solution son pouvoir isotonique ; tandis que les autres : sulfates, phosphates, carbonates, jouent le rôle de tampon et permettent une stabilisation rigoureuse du pH.

Cette solution contient également du glucose à la concentration de 1 gramme par litre. On y apporte les acides aminés indispensables sous forme d'hydrolysat de lactalbumine à la dose de 5 grammes par litre de solution de Hanks. Ces éléments nutritifs essentiels sont complémentés par l'addition, extemporanée, de 10 % de sérum de cheval [1] ou de sérum bovin. Le milieu ainsi composé est celui décrit par Melnick et Riordan (1952).

On ajoute enfin certains facteurs de croissance sous la forme de levure de bière : 2 millilitres par litre de milieu.

Un indicateur coloré, le rouge de phénol, colore le milieu en rouge dans des limites de pH comprises entre 6,5 et 8. Il permet, à la très faible concentration de 0,001 % d'apprécier le degré d'acidité du milieu de culture.

La stérilité, qui doit être parfaite, est obtenue par filtration du sérum et du milieu sur entonnoir filtre en verre fritté et par addition d'antibiotiques : pénicilline

(1) Le sérum de cheval nous a été gracieusement fourni par l'Institut de Sérothérapie de Toulouse.

(200 000 unités par litre) et streptomycine (50 µg par litre) [2].

Sérum et milieu sont conservés avant leur mélange au réfrigérateur à + 4 degrés, puis réchauffés progressivement dans un bain-marie à 37 degrés avant l'emploi.

### 2° *Le milieu de culture expérimental*

C'est le milieu stock dans lequel ont été réalisées des concentrations variables d'hormone.

Nous avons utilisé des comprimés d'hormone pure cristallisée dosée à 20 mg pour l'œstradiol, à 100 mg pour la progestérone et à 100 mg pour la testostérone [3]. Ces comprimés sont mis en solution dans l'alcool éthylique absolu de façon à réaliser, pour chaque hormone, les concentrations respectives de : 50, 125, 500, 1 250, 2 500, 5 000, 10 000 et 12 500 µg/ml. Ces solutions hormonales alcoliques sont conservées à — 15 degrés.

Au moment de la mise en culture, 1/10 de millilitre de ces solutions est ajouté à 25 ml du milieu de culture, de telle sorte que la concentration finale d'alcool dans ce milieu n'excède pas 0,4 %.

Pour chaque expérimentation, les doses hormonales ainsi réalisées au contact de la cellule ont donc été de 0,2, 0,5, 2, 5, 10, 20, 40 et 50 µg/ml de milieu.

Des cultures témoins, en milieu normal, ont toujours été réalisées parallèlement, ainsi que des cultures de contrôle, comportant dans leur milieu une concentration identique d'alcool absolu.

Afin de prouver l'activité normale des hormones sexuelles mises en solution alcoolique, nous avons testé en particulier le pouvoir œstrogène de l'œstradiol alcoolique sur huit Rates castrées depuis cinq mois. L'ap-

---

(2) Nous remercions les Laboratoires SPECIA qui nous ont régulièrement fourni tous les antibiotiques nécessaires à ce travail.

(3) Nous remercions vivement les Laboratoires ROUSSEL qui nous ont aimablement fourni les hormones nécessaires à ce travail.

parition de nombreuses cellules kératinisées dans les frottis vaginaux après cinq injections sous-cutanées de 120 µg d'œstradiol a confirmé la persistance de l'activité œstrogénique de l'hormone mise en solution alcoolique.

## II. Techniques de culture

### 1° *La technique d'entretien des stocks cellulaires*

Les cellules des cultures stocks sont cultivées en flacons de Roux de 500 ou 1 000 ml placés horizontalement dans une étuve à 37 degrés C. Chacun de ces flacons est ensemencé avec 40 ou 60 ml de milieu contenant environ 300 000 cellules par millilitre. Le milieu est renouvelé tous les deux ou trois jours, dès que l'on observe son acidification, comme le montre le jaunissement du rouge de phénol.

Le repiquage est fait par trypsinisation une fois par semaine environ. Le rythme de la trypsinisation dépend en fait de la rapidité de la croissance, et le repiquage est pratiqué dès que le fond du flacon de Roux est uniformément recouvert par un voile cellulaire. On opère de la façon suivante : après avoir aspiré le milieu de culture, on le remplace par une solution de trypsine [4] à 0,25 % dans du P.B.S. [5] et en quantité telle que la totalité de la nappe cellulaire soit recouverte. Puis on laisse en contact trente minutes à l'étuve à 37 degrés C. et on achève de disjoindre les amas cellulaires par aspiration et refoulement successifs à la pipette. La suspension cellulaire obtenue est alors centrifugée à 800 tours/minute pendant quatre minutes. On aspire ensuite le liquide surnageant et on dilue le culot dans quelques centimètres cubes de milieu par

(4) Trypsine Difco.
(5) Phosphate Buffered saline.

aspirations successives à la pipette. Il faut alors rechercher la concentration cellulaire de ce culot dilué, par comptage à l'hématimètre de Thoma et, partant du chiffre obtenu, ajouter au culot une quantité déterminée de milieu permettant d'obtenir une concentration finale de 250 000 à 300 000 cellules par millilitre.

### 2° *Techniques expérimentales*

Les cultures expérimentales sont réalisées dans des boîtes de Pétri à fond plat sur lequel on a déposé quatre lamelles de verre de taille standard : 24 × 24 mm. Ces lamelles sont fixées au fond de la boîte de Pétri par leur face inférieure recouverte d'un peu de vaseline stérile. On ensemence ensuite ces boîtes de Pétri avec 25 millilitres de milieu additionné de cellules isolées par trypsinisation à la concentration habituelle de 300 000 éléments par millilitre. Après quarante-huit heures d'incubation à l'étuve à 37 degrés C., période nécessaire à la croissance cellulaire et dont nous avons précédemment justifié le choix, le milieu est rejeté et remplacé par un liquide fixateur, le liquide de Carnoy. Après vingt minutes de fixation, on prélève les lamelles recouvertes de cellules et on va les colorer par l'hémalun-éosine, les déshydrater et les monter au baume de Canada.

Chaque expérimentation a comporté, par souche, dix boîtes de Pétri : une témoin, une contrôle contenant le milieu alcoolisé sans hormone, et huit pour les huit dosages hormonaux. La méthode utilisée a déjà été décrite par Moore, Brandkamp et Burnes (1959). Nous avons réalisé en moyenne cent cultures pour chacune des hormones étudiées et pour chaque souche.

## III. Méthodes d'appréciation de la croissance cellulaire

### 1° *Numération et index cinétique*

La croissance a été d'abord appréciée par l'étude de la densité cellulaire sur les lamelles.

On choisit, pour chaque préparation, le point de plus grande densité cellulaire et l'on va compter au micromètre oculaire le nombre de cellules comprises dans une surface donnée, ce qui revient à numérer environ quatre mille cellules pour les quatre lamelles de la boîte de culture témoin. On ramène ensuite à cent le nombre obtenu et le coefficient de division ainsi trouvé est appliqué à toutes les cultures de la même expérimentation. Ces opérations, en donnant à toutes les cultures témoins la même valeur, vont permettre de comparer ultérieurement les résultats de toutes les cultures expérimentales. Ce premier calcul permet donc d'étudier, en fonction des doses variables d'hormone dans le milieu, le pourcentage d'action de ces substances sur la croissance cellulaire appréciée seulement par l'augmentation du nombre des cellules en fonction du temps.

Un deuxième critère d'appréciation de la croissance est l'index cinétique. Celui-ci exprime le pourcentage de cellules en mitose par rapport au nombre total des cellules. Si N est le nombre total des cellules de la numération, M le nombre des éléments en mitose, l'index cinétique pour cent cellules : Ic, est donné par la formule $Ic = \frac{M \times 100}{N}$.

Cet index est seulement valable si N est égal ou supérieur à mille cellules (Paul, 1960), condition qui a toujours été réalisée lors de nos mesures.

L'intérêt de cette méthode de comptage sur lamelles colorées est triple, car en dehors de l'interprétation quantitative que nous venons d'exposer, elle permet également une étude qualitative des éléments cellulaires et le calcul de l'index cinétique. De plus, la préparation n'est plus altérable et ce calcul peut être fait ou vérifié à tout moment.

### 2° *Autres méthodes*

Elles n'ont été utilisées que dans un but de contrôle des méthodes déjà exposées.

a) *La tomophotométrie.*

La densité cellulaire sur les lamelles a été parfois si homogène que nous avons pu utiliser l'histophotomètre. Dans ce cas, toutes les lamelles sont colorées en même temps et l'absorption lumineuse de la culture témoin est prise pour base. L'utilisation de petits grossissements, d'une part, et de faisceaux lumineux d'analyse importants, d'autre part, fait calculer directement à la cellule photoélectrique une moyenne d'absorption lumineuse portant sur 10 000 à 30 000 cellules.

Cette technique, dont l'avantage incontestable est sa très grande rapidité, n'est malheureusement utilisable que dans les rares cas d'une répartition très homogène et d'une coloration parfaite. Elle nous a cependant permis de contrôler, pour certaines séries expérimentales, les résultats obtenus avec la méthode choisie.

b) *L'hématimétrie.*

Cette méthode, décrite par Takano, Yamada et Yaginuma (1956), permet de calculer le nombre total des cellules cultivées en numérant non seulement les cellules fixées sur les parois du récipient de culture, mais également les cellules libres, en suspension dans le milieu.

Nous avons appliqué cette technique dans quelques séries expérimentales. Dans ce cas, la culture est pratiquée en flacons d'Erlenmeyer de 100 millilitres. Au bout de quarante-huit heures, on ajoute au milieu de l'acide citrique M/10 en quantité égale à cinq fois celle du milieu en contact avec les cellules. On laisse agir cet acide une heure à 37 degrés C. en agitant constamment. Les éléments cellulaires se détachent alors des parois et les cellules éclatent en libérant leurs noyaux qui seuls persistent. On centrifuge le mélange à mille tours par minute pendant vingt minutes. On remet en suspension le culot de noyaux, en le brassant à la pipette dans 1 millilitre de liquide surnageant et l'on ajoute une solution de cristal Violet à 0,1 % dans l'acide citrique M/10. Les noyaux ainsi colorés peuvent être conservés au réfrigérateur pendant plusieurs jours avant que le comptage soit effectué en cellule de Mallassez. Les résultats obtenus par cette méthode ont été également superposables à ceux obtenus par la méthode choisie.

## CHAPITRE IV

# Résultats

Nous étudierons successivement :

1° Les cultures faites en milieu normal et les cultures de contrôle pratiquées en présence d'alcool éthylique. Rappelons en effet que l'alcool éthylique a été utilisé comme solvant des hormones ;

2° L'action analytique des trois hormones génitales : œstradiol, progestérone et testostérone sur la densité cellulaire sur lamelle et l'index critique des deux souches HeLa et K.B. ;

3° L'action comparative des trois hormones sur les deux souches cellulaires tumorales, ce qui nous amènera à préciser les différences de réceptivité qui peuvent exister entre ces deux souches vis-à-vis des hormones génitales.

*
**

## I. Cultures témoins et de contrôle

L'addition d'alcool éthylique, sans addition de produits hormonaux, réalisée dans les cultures de contrôle, n'apporte pas de modification appréciable de la morphologie cellulaire ou de l'index cinétique, comme le montre la comparaison avec les cultures témoins. Cependant, l'index cinétique s'élève parfois légèrement, comme l'indiquent les valeurs rapportées dans les tableaux des figures 4 et 6.

La croissance cellulaire, calculée d'après la densité des cellules sur les lamelles de culture, n'est pas modifiée de façon importante dans le cas de la souche HeLa (fig. 3). Elle subit, dans le cas de la souche K.B., un effet légèrement favorable (fig. 5). Dans les deux cas, le taux de variation moyen est faible : il est de — 7,33 % pour la souche HeLa et de + 11,33 % pour la souche K.B.

La présence de ces variations, dues à l'alcool seul, nous a conduit à pratiquer, pour chaque série expérimentale, des cultures de contrôle, celles-ci servant d'éléments de référence.

## II. Étude analytique de l'action hormonale sur les deux souches

### 1° *Souche cellulaire HeLa*

a) *Action de l'œstradiol.*

L'œstradiol provoque régulièrement une inhibition de la croissance cellulaire. Dès la dose de 0.2 µg/ml de milieu, la densité cellulaire sur les lamelles de culture est diminuée, le taux d'inhibition étant de 27 %. Cet effet s'accentue pour les doses plus fortes, les taux d'inhibition étant de 62 % pour 2 µg, 88 % pour 5 µg et 95 % pour 10 µg (fig. 4). A partir de 20 µg, les lamelles sont dépourvues de tout élément cellulaire.

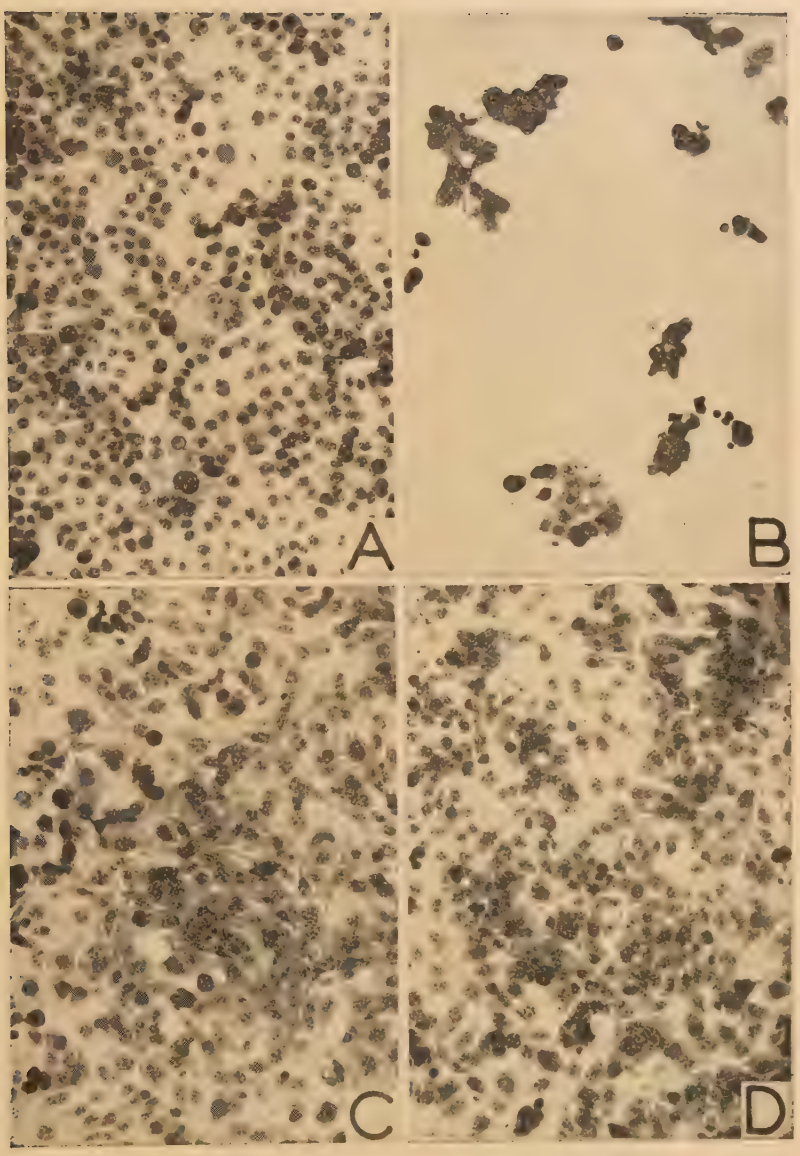


FIGURE 2.

*Exemple de différence de réceptivité : action de l'œstradiol sur les souches cellulaires tumorales HeLa et K.B. à la dose de* 10 $\mu g$ (coloration à l'hémalun éosine).

A et B. — Souche HeLa. — A : culture témoin ; la culture B traitée montre une inhibition de la densité cellulaire d'environ 95 %.

C et D. — Souche K.B. — C : culture témoin ; la culture D traitée conserve une densité cellulaire identique à la culture témoin.

| | ŒSTRADIOL | PROGESTÉRONE | TESTOSTÉRONE |
|---|---|---|---|
| Normal | 0 % | 0 % | 0 % |
| Contrôle | — 7 % | + 5 % | — 10 % |
| 0,2 µg | — 27 % | — 3 % | — 37 % |
| 0,5 µg | | | — 49 % |
| 2 µg | — 62 % | — 1 % | — 54 % |
| 5 µg | — 88 % | — 32 % | — 64 % |
| 10 µg | — 95 % | — 52 % | — 73 % |
| 20 µg | — 100 % | — 63 % | — 81 % |
| 40 µg | — 100 % | | — 85 % |
| 50 µg | | — 90 % | — 84 % |

FIGURE 3.

Souche HeLa. — *Taux de variation de la croissance cellulaire.*

L'index cinétique n'est pas modifié après addition de 0,2 µg d'œstradiol. Il s'abaisse par contre de façon sensible pour la concentration de 5 µg par millilitre et s'annule pour les concentrations plus fortes (fig. 4).

Du point de vue morphologique, le ralentissement de l'activité cinétique se traduit par un accroissement de la proportion des éléments en voie de dégénérescence (fig. 2). On observe ainsi, dès la dose de 0,2 µg d'œstradiol, la présence de nombreux éléments cellulaires, de petite taille, de contours arrondis, au cytoplasme dense et très chromatophile et aux noyaux pycnotiques. Ces éléments sont généralement groupés en îlots éloignés les uns des autres. Les mitoses conservent le caractère qu'elles présentaient déjà dans les cultures faites en milieu normal. On peut ainsi observer des chromosomes retardés ou des mitoses pluripolaires. Les cultures traitées contiennent également une faible

proportion d'éléments cellulaires géants, à noyaux volumineux, très probablement polyploïdes. Les éléments en voie de dégénérescence se détachent secondairement des lamelles et se mobilisent dans le milieu de culture où on peut les retrouver ensuite, après centrifugation.

Toutes les cellules d'une même culture ne présentent pas ces figures dégénératives et l'on peut observer, même avec les doses les plus fortes d'œstradiol, des cellules tumorales ayant conservé encore leur aspect normal.

b) *Action de la progestérone.*

Comme le montre la figure 3, la progestérone exerce vis-à-vis de la souche HeLa une action inhibitrice. Celle-ci est toutefois plus faible que celle de l'œstradiol. Ainsi, la croissance cellulaire reste normale pour les doses faibles et l'effet inhibiteur ne se manifeste qu'à partir de la concentration de 5 µg/ml où le taux d'inhibition est de 32 %. A 10 µg, il est de 52 % et atteint 63 % à 20 µg. Il faut utiliser la dose élevée de 50 µg de progestérone par millilitre de milieu pour faire disparaître la presque totalité des éléments cellulaires des lamelles de culture, puisque l'inhibition est alors de 90 %.

L'index cinétique diminue de façon sensible dès la dose de 2 µg/ml, mais il ne s'annule qu'avec la concentration de 50 µg/ml (fig. 4).

Du point de vue histologique, la progestérone donne naissance aux mêmes images dégénératives que l'œstradiol.

c) *Action de la testostérone.*

L'action de la testostérone a été étudiée en fonction de doses plus nombreuses que celles utilisées pour les deux hormones femelles.

Comme le montre la figure 3, la testostérone provoque là encore une inhibition de la croissance cellulaire,

qui augmente régulièrement suivant les doses choisies. Cette action défavorable de l'hormone mâle se manifeste dès la plus faible concentration, c'est-à-dire pour 0,2 µg/ml, où le taux d'inhibition est de 37 %. Il s'accroît ensuite progressivement et prend les valeurs suivantes : 49 % pour 0,5 µg, 54 % pour 2 µg, 64 % pour 5 µg, 73 % pour 10 µg, 81 % pour 20 µg, 85 % pour 40 µg et 84 % pour 50 µg. Nous n'avons donc pas obtenu d'inhibition réellement totale, même avec les plus fortes concentrations hormonales.

| | ŒSTRADIOL | PROGESTÉRONE | TESTOSTÉRONE |
|---|---|---|---|
| Normal | 2,3 | 2,8 | 1,8 |
| Contrôle | 2,3 | 2,9 | 2 |
| 0,2 µg | 2 | 2,7 | 1,8 |
| 0,5 µg | | | 2 |
| 2 µg | 0,6 | 1,8 | 1,5 |
| 5 µg | 0,3 | 1,6 | 1,7 |
| 10 µg | 0 | 1,3 | 0,6 |
| 20 µg | 0 | 0,2 | 1,3 |
| 40 µg | 0 | | 0,7 |
| 50 µg | | 0 | 1,5 |

FIGURE 4.

Souche HeLa. — *Variation de l'index cinétique.*

L'activité cinétique reste normale jusqu'à la concentration de 0,5 µg/ml. A partir de cette concentration, l'index cinétique s'abaisse de façon sensible, sans s'annuler toutefois, même pour les doses les plus élevées de testostérone (fig. 4).

Du point de vue histologique, la testostérone provoque des altérations dégénératives identiques à celles produites par l'œstradiol.

### 2° *Souche cellulaire K.B.*

a) *Action de l'œstradiol.*

L'œstradiol n'exerce pas d'action notable jusqu'à la concentration pourtant élevée de 10 µg/ml (fig. 5). Les taux de variations sont ainsi de + 16 % pour 0,2 µg, — 10 % pour 2 µg, — 8 % pour 5 µg et + 5 % pour 10 µg. Par contre, à la dose de 20 µg/ml, l'œstradiol altère les cultures cellulaires et provoque une inhibition de croissance de l'ordre de 45 %. Le taux d'inhibition s'élève ensuite brutalement à 90 % pour la concentration de 40 µg/ml.

L'activité cinétique reste normale jusqu'à la dose de 20 µg/ml. Elle s'annule brusquement au delà (fig. 6).

Du point de vue histologique, l'œstradiol provoque, aux fortes concentrations, des altérations dégénératives notables qui accentuent le caractère normalement dispersé des cultures. On sait en effet que les cellules K.B. sont plus étalées et ramifiées que les cellules HeLa. Après addition d'œstradiol, les cellules se rétractent, tendent à s'isoler les unes des autres et ne restent réunies entre elles que par de très fins prolongements filiformes. Le cytoplasme, fortement chromatophile, est fréquemment granuleux. Les noyaux deviennent pycnotiques. Comme dans les cultures normales, des chromosomes retardés sont fréquemment observés dans les cellules en mitose. En fin de dégénérescence, les cellules, de contours arrondis, au cytoplasme fortement acidophile, s'isolent entièrement des éléments voisins et finissent par se mobiliser dans les milieux de culture. Ces modifications morphologiques ne sont constatées qu'aux doses de 20 et 40 µg où leur apparition est brutale. Les cultures effectuées aux concentrations hormonales plus faibles ne présentent aucune différence avec les cultures normales (fig. 2).

b) *Action de la progestérone.*

L'action de la progestérone est comparable à celle de l'œstradiol, bien qu'elle semble être légèrement moins active (fig. 5). La croissance cellulaire reste ainsi normale jusqu'à la concentration de 10 µg/ml, elle se ralentit peu à la concentration de 20 µg/ml où le taux d'inhibition n'est que de 27 %. Mais ce dernier atteint brusquement 78 % pour la concentration de 50 µg/ml.

L'index cinétique est normal jusqu'à la concentration de 10 µg/ml. Il s'abaisse très légèrement pour 20 µg/ml et s'annule à la concentration de 50 µg/ml.

Du point de vue histologique, la progestérone n'apporte de modifications sensibles qu'à partir de la concentration de 20 µg. Encore, à cette dose, les images dégénératives sont-elles rares et discrètes. Elles correspondent aux phénomènes déjà observés pour des doses plus faibles d'œstradiol.

| | ŒSTRADIOL | PROGESTÉRONE | TESTOSTÉRONE |
|---|---|---|---|
| Normal | 0 % | 0 % | 0 % |
| Contrôle | + 3 % | + 8 % | + 23 % |
| 0,2 µg | + 16 % | + 6 % | + 26 % |
| 2 µg | — 10 % | + 9 % | + 22 % |
| 5 µg | — 8 % | + 15 % | + 16 % |
| 10 µg | + 5 % | 0 % | — 8 % |
| 20 µg | — 45 % | — 27 % | — 9 % |
| 40 µg | — 90 % | | — 57 % |
| 50 µg | | — 78 % | — 63 % |

FIGURE 5.

Souche K.B. — *Taux de variation de la croissance cellulaire.*

c) *Action de la testostérone.*

La testostérone n'exerce aucun effet inhibiteur marqué jusqu'à la dose pourtant très élevée de 20 µg/ml. Par contre, à la dose de 40 µg, le taux d'inhibition s'élève brutalement à 57 %. A la dose de 50 µg/ml, de nombreuses cellules persistent encore sur les lamelles, le taux d'inhibition étant de 63 %. Pour les doses plus faibles, la croissance cellulaire semble ici accélérée : le taux de variation est en effet de 26 % et 22 % supérieur à la croissance normale pour les doses respectives de 0,2 et 2 µg/ml. En réalité, il convient de rapporter ces taux de croissance aux cultures de contrôle pratiquées dans ces séries (fig. 5). Dans ce cas particulier, la seule addition d'alcool a provoqué une accélération notable de la croissance cellulaire puisque la densité cellulaire est de 23 % supérieure à celle des cultures normales. On peut conclure de ces faits que la testostérone ne paraît pas en réalité avoir d'action sur la croissance de la souche K.B. lorsqu'elle est utilisée à faible concentration.

| | ŒSTRADIOL | PROGESTÉRONE | TESTOSTÉRONE |
|---|---|---|---|
| Normal | 1,2 | 1,1 | 1,1 |
| Contrôle | 1,3 | 1,2 | 1,7 |
| 0,2 µg | 1,5 | 1,1 | 1,8 |
| 2 µg | 1,4 | 1,2 | 1,7 |
| 5 µg | 1,3 | 1,3 | 1,5 |
| 10 µg | 1,4 | 1,3 | 1,6 |
| 20 µg | 1,2 | 1 | 2 |
| 40 µg | 0 | | 2,6 |
| 50 µg | | 0 | 3,5 |

FIGURE 6.

Souche K.B. — *Variation de l'index cinétique.*

L'index cinétique fait ici l'objet de modifications particulières. Jusqu'à la dose de 20 µg, il conserve une valeur normale et son évolution est alors parallèle à celle de la densité cellulaire. Par contre, pour des doses plus élevées, alors que la croissance cellulaire apparaît brusquement inhibée, l'index cinétique ne subit aucun effet défavorable ; au contraire, il tend même à s'élever, passant de 1,6 pour 10 µg, à 2,6 pour 40 µg et à 3,5 pour 50 µg.

Du point de vue histologique, les phénomènes dégénératifs observés avec les doses fortes d'hormone sont comparables aux phénomènes déjà décrits, mais on est frappé par la fréquence des figures mitotiques dont la majorité correspond à des métaphases.

## III. Étude comparative des résultats

Les résultats que nous venons de rapporter vont nous permettre de comparer les actions de trois hormones génitales vis-à-vis des souches cellulaires HeLa et K.B.

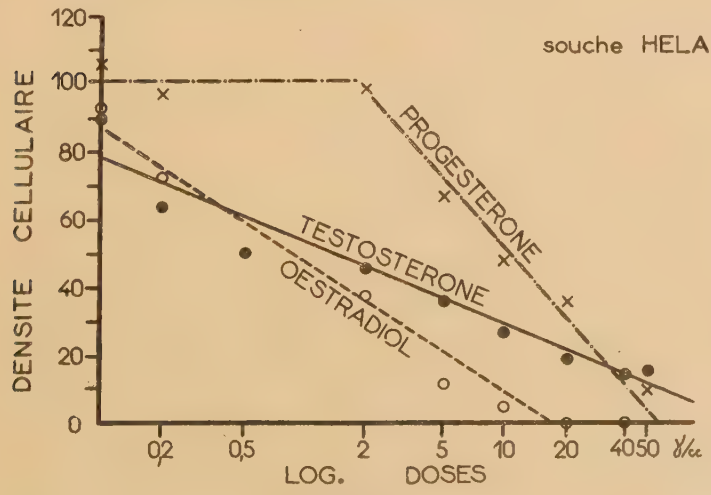


FIGURE 7.

*Action comparée des trois hormones génitales sur la souche HeLa.*

*Dans le cas de la souche HeLa*, les trois hormones exercent donc une action défavorable, l'œstradiol étant la plus active, la progestérone exerçant la plus faible action (fig. 7). Toutefois, il semble que l'on puisse nettement différencier les actions de l'œstradiol et de la testostérone de celle de la progestérone. En effet, comme le montre la figure 13, l'œstradiol et la testostérone exercent leur activité de façon progressive et continue depuis les doses les plus faibles. La progestérone, au contraire, ne manifeste une activité inhibitrice qu'à partir de la dose de 5 µg, son action étant alors brutale.

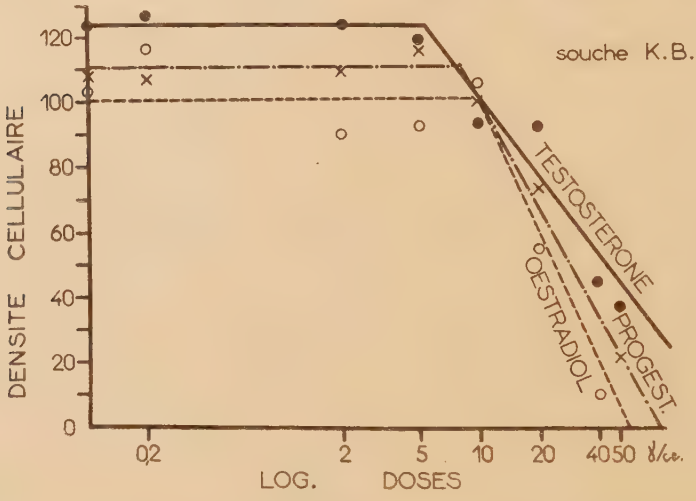


FIGURE 8.
*Action comparée des trois hormones génitales sur la souche K.B.*

*Dans le cas de la souche K.B.*, on retrouve, pour les trois hormones génitales, une action comparable à celle que nous venons de rapporter pour la progestérone au niveau de la souche HeLa. Les trois hormones se montrent en effet inactives jusqu'à la dose de 10 µg, ce qui se traduit sur la figure 8 par une courbe en plateau identique pour les trois hormones. Leur pouvoir inhibiteur se manifeste ensuite brusquement dès la dose de 20 µg et leurs actions sont alors rigoureusement comparables.

Par ailleurs, les résultats de nos recherches, en prouvant que l'activité des trois hormones génitales est différente selon la souche que l'on considère, tendent

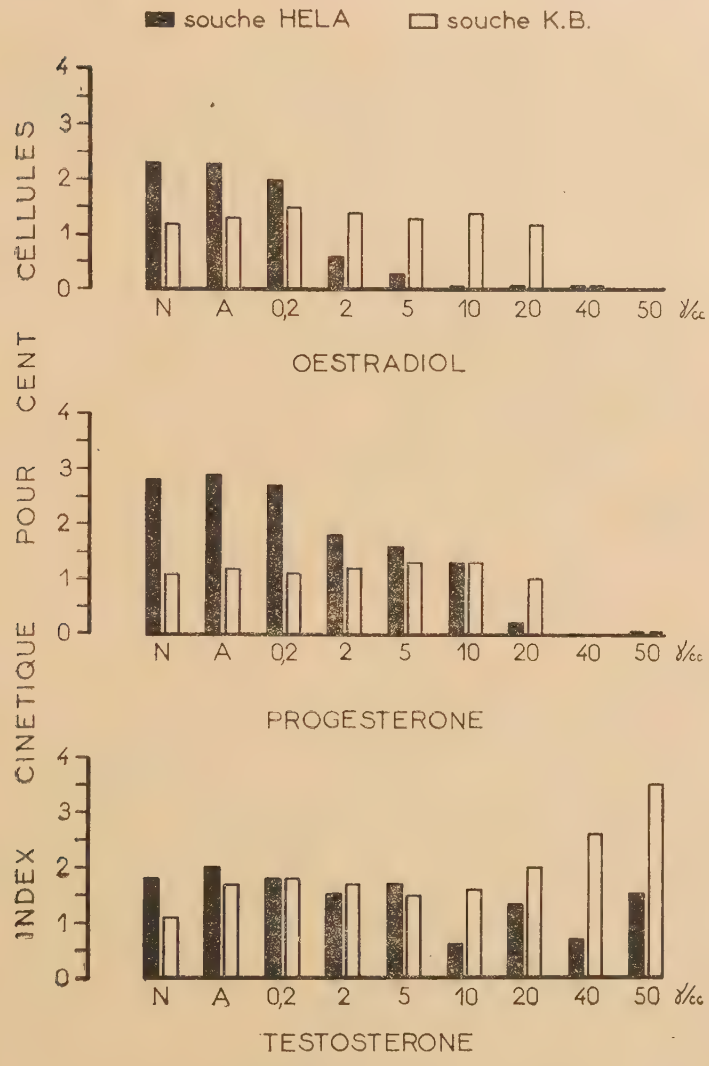


FIGURE 9.

*Action respective comparée des hormones génitales sur l'index cinétique des souches HeLa et K.B.*

à montrer qu'il existe une différence de réceptivité entre les souches HeLa et K.B. Cette différence de réceptivité se manifeste également pour chacune des trois hormones étudiées.

— L'*œstradiol* exerce dans les deux cas une action défavorable, mais celle-ci est plus importante au niveau de la souche HeLa (fig. 10). La différence d'activité la plus marquée s'observe pour la dose de 10 µg/ml

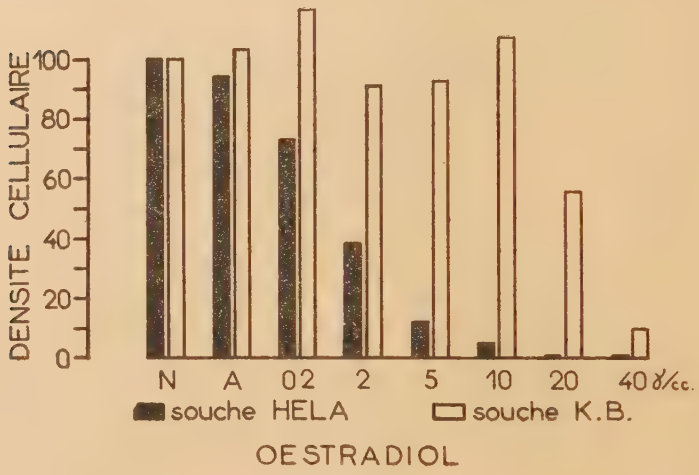


FIGURE 10.

*Action comparée de l'œstradiol sur la croissance, exprimée d'après la densité cellulaire, des souches HeLa et K.B.*

où la densité cellulaire est rigoureusement normale pour la souche K.B., alors qu'elle est pratiquement nulle dans le cas de la souche HeLa pour cette même concentration. D'autre part, alors que l'activité inhibitrice se manifeste progressivement dès la dose de 0,2 µg pour les cellules HeLa, cette inhibition est plus tardive et plus brutale pour la souche K.B.

Les mêmes phénomènes se retrouvent dans l'étude des variations de l'index cinétique, comme nous le montre la figure 9.

— La *progestérone* exerce également une action défavorable sur la croissance des deux souches, mais, comme le montre la figure 11, son pouvoir inhibiteur est nettement plus marqué pour les cellules HeLa.

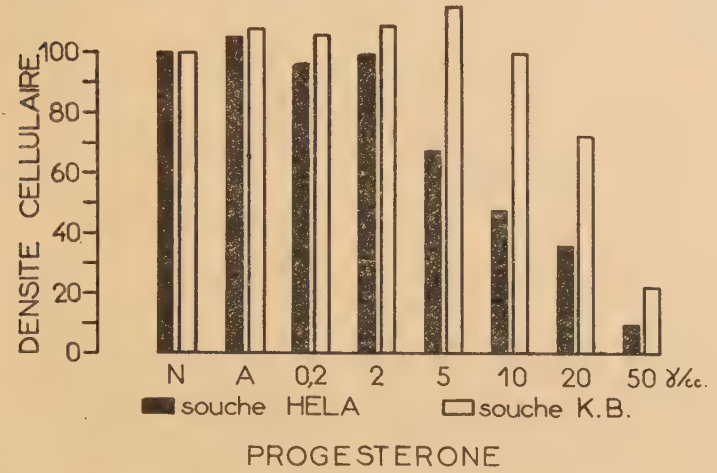


FIGURE 11.

*Action comparée de la progestérone sur la croissance des souches HeLa et K.B.*

— La *testostérone*, enfin, nous montre une semblable différence de réceptivité et la souche HeLa est encore la plus sensible (fig. 12). En ce qui concerne cette souche, l'activité de la testostérone s'identifie en grande partie à celle de l'œstradiol et s'observe en effet dès les plus faibles concentrations. Au contraire, la souche K.B. paraît remarquablement résistante à l'action défavorable de cette hormone puisqu'elle n'y devient sensible que pour la dose très élevée de 40 µg, c'est-à-dire pour une dose où les autres hormones inhibent déjà très fortement la croissance des cellules tumorales.

Cependant, malgré cet effet inhibiteur, l'index cinétique ne fait l'objet d'aucune variation régressive, et cela dans le cas des deux souches. Mais nous retrouvons ici encore une remarquable différence de réceptivité.

En effet, alors que l'index cinétique conserve une valeur normale pour la souche HeLa, il va s'élever de façon très prononcée pour les cellules K.B. (fig. 9). Pour être plus précis, il augmente par rapport à l'index cinétique des cultures de contrôle de 52,94 % pour la dose de 40 µg et de 105,88 % pour la dose de 50 µg.

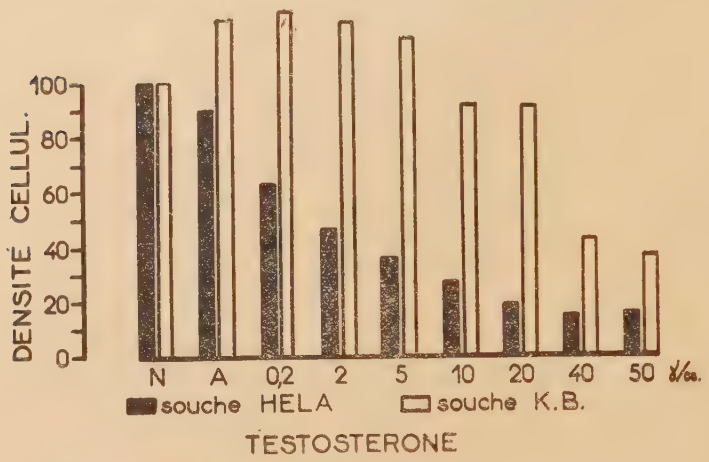


FIGURE 12.

*Action comparée de la testostérone sur la croissance des souches HeLa et K.B.*

Remarquons que les faits que nous venons de rapporter sont spécifiques de la testostérone et n'ont pas été retrouvés ni ébauchés dans le cas des hormones femelles.

Signalons enfin que si les deux souches présentent une différence de comportement vis-à-vis des trois hormones génitales, il convient de noter que sur le plan morphologique les cellules HeLa et K.B. présentent les mêmes phénomènes dégénératifs lorsqu'elles sont en présence de doses plus ou moins élevées d'hormones, exception faite pour la testostérone qui détermine l'apparition de quelques éléments bloqués en métaphase.

## CHAPITRE V

# Discussion

L'analyse des résultats de nos recherches vient de nous montrer que l'activité des trois hormones génitales étudiées se manifestait toujours dans le même sens inhibiteur vis-à-vis de la croissance des deux souches cellulaires tumorales HeLa et K.B.

I. — On peut, en premier lieu, se demander si cette identité d'action ne traduit pas l'utilisation de concentrations hormonales trop élevées dans le milieu de culture. Nous comparerons donc, dans un premier temps, les valeurs de nos doses expérimentales aux taux des hormones dans le sang, nous envisagerons ensuite les concentrations hormonales utilisées par de nombreux auteurs *in vitro*, avant d'éliminer le rôle possible du solvant.

— Les taux des hormones génitales dans le sang nous donnent en effet une idée des limites entre lesquelles peut varier physiologiquement la concentration hormonale au contact de la cellule.

Chez la Femme non gravide, le taux d'*œstradiol* du sang périphérique varie entre 2 et 5 µg par litre selon les dosages biologiques rapportés par Smith (1955).

Veldhuis (1953) donne, par l'emploi de méthodes biochimiques, les valeurs nettement plus élevées de 39 à 50 µg par litre. En réalité, les dosages chimiques récents tendent à confirmer les données de Smith. Ainsi, Roy et Brown (1959-1960) estiment à 0,5 µg pour 100 millilitres la concentration sanguine d'œstrone et d'œstradiol tandis qu'il y aurait de 0,01 à 5 µg % d'œstriol. Enfin Villee, qui a étudié *in vitro* l'activité des œstrogènes sur un système enzymatique, estime que la concentration physiologique de l'hormone dans son milieu d'incubation est réalisée pour la concentration de 0,001 µg par millilitre.

La *progestérone* se trouve à des concentrations bien plus élevées puisque Smith (1955) estime à 1,7 ou 5,2 µg par millilitre la concentration plasmatique de cette hormone chez la Femme en période préovulaire. Ici encore, les dosages biochimiques récents abaissent fortement ces chiffres et Oertel, Weiss et Eiknes (1959) n'ont pas trouvé de variation significative du taux de l'hormone pendant le cycle menstruel, les valeurs extrêmes étant de 2,5 à 5 µg %. Avec la même technique, Hervé et Sergent (1961) donnent les taux de 1 µg % chez l'Homme et 2 à 3,75 µg % chez la Femme. Il faut d'autre part noter que Sommerville et Marrion (1960) trouvent 12 à 18 µg pour 100 millilitres de glycuronide de prégnandiol, cette forme d'élimination possédant encore l'activité biologique de l'hormone, et 3 à 4 µg % de progestérone. Chez l'animal, on retrouve des valeurs identiques : 0,41 et 2,36 µg par millilitre dans la veine ovarienne du Lapin et 0,06 µg dans le sang périphérique (Mikhail, Noall et Allen, 1961) et 8 µg par millilitre dans le sang périphérique de la Souris gestante (Forbes et Hooker, 1957).

Moins bien connu, le taux sanguin de la *testostérone* serait chez l'Homme de 1 µg pour 100 millilitres (Lucas, Withmore et West, 1957). Ces résultats correspondent

à ceux que l'on rencontre chez l'animal : 0 à 7 µg % chez le Chien (Brinck-Johnsen et Eik-Nes, 1957 ; Mason et Samuels, 1961), 1,6 à 5 µg % chez le Taureau (Damby, 1940 ; Savard et collaborateurs, 1961).

Il est évidemment difficile de discuter les rapports qui peuvent exister entre des cellules de l'organisme soumises à l'imbibition plasmatique par un étroit système capillaire et des cellules totalement en contact *in vitro* avec un abondant milieu hormonal. Si l'on admet cependant une correspondance assez étroite entre ces deux modes de vie, on peut penser que les concentrations hormonales physiologiques d'un milieu de culture doivent se situer autour des valeurs de 0,002 à 0,05 µg/ml pour l'œstradiol, 0,02 à 6 µg/ml pour la progestérone et 0,01 à 0,07 µg/ml pour la testostérone. Or les doses que nous avons utilisées s'échelonnent entre 0,2 et 50 µg/ml. Notre expérimentation a donc porté sur une gamme de concentrations hormonales située en dehors des limites physiologiques optimales.

— Cependant, les nombreux travaux antérieurs utilisant des concentrations hormonales identiques et même supérieures aux doses que nous avons employées fournissent la preuve qu'elles ne sont pas toxiques pour les cellules en culture. On constate d'ailleurs que pour ces mêmes concentrations les auteurs ont le plus souvent signalé des effets bénéfiques sur la croissance cellulaire. C'est ainsi que l'*œstradiol* utilisé par Kahn (1954) à la dose de 1,3 µg/ml provoque la kératinisation normale de l'épithélium vaginal de la Souris. Kullander et Kallen (1959) étudient l'activité de l'œstrone sur des explants d'une tumeur ovarienne expérimentale et l'hormone à la concentration de 15 µg par millilitre s'est révélée inactive, et n'a, en tout cas, provoqué aucun ralentissement de croissance ni aspect dégénératif des cultures. Monesi (1956) utilise l'œstradiol aux doses de 10 et 50 µg/ml sur des explants d'adénocarcinome d'Ehrlich et, pour la dernière dose, qui

correspond à notre concentration optimale, l'auteur constate un effet activateur considérable puisque l'augmentation de l'étendue de migration de la nappe épithéliale à partir de l'explant est de l'ordre de 400 %. Bimes, Planel et David (1961) ont d'ailleurs étudié plus précisément ce problème des doses élevées d'œstradiol en comparant l'activité de cette hormone sur la souche HeLa avec celle observée dans les mêmes conditions expérimentales sur le fibroblaste de Poulet, le fibroblaste utérin humain et l'épithélium utérin du Rat. Ils montrent que les doses de 2,5 à 20 µg/ml sont inactives et nullement inhibitrices sur ces trois types cellulaires, alors qu'elles sont défavorables à la croissance de la souche HeLa. Nous retrouvons pour la *progestérone* des conditions semblables, et Monesi montre l'effet très favorable de cette hormone sur la croissance de l'adénocarcinome d'Ehrlich pour la concentration de 10 µg/ml, cet effet persistant, mais plus atténué, pour 50 µg/ml.

La *testostérone*, par contre, se révèle en général inhibitrice pour des doses semblables, cet effet paraissant spécifique de l'hormone puisque l'inhibition de croissance ne s'accompagne pas de phénomènes dégénératifs qui traduiraient la toxicité brutale. Monesi (1956) constate cette légère inhibition pour 10 et 50 µg/ml, effet qui est retrouvé pour cette dernière dose par Rota (1958). Kullander et Kallen (1959) ne retrouvent cette inhibition que dans 40 % des cas avec la dose de 25 µg/ml. Enfin les travaux de Bimes, Planel et David (1961) viennent confirmer ces faits puisque la dose de 20 µg/ml, qui provoque effectivement une inhibition d'environ 20 % sur la croissance des trois types cellulaires étudiés, ne s'accompagne d'aucune lésion cytologique.

— Ce bref rappel de travaux superposables aux nôtres quant aux doses hormonales en cause, nous per-

met d'établir, avec une assez grande certitude, le caractère non toxique et seulement supraphysiologique des concentrations hormonales que nous avons utilisées. On peut d'ailleurs, pour confirmer ces faits, rapporter quelques travaux dans lesquels l'utilisation de taux hormonaux beaucoup plus élevés n'a pas eu d'effet sur le comportement cellulaire de tissus cultivés *in vitro*. C'est ainsi qu'EMMENS et LUDFORD (1940) signalent que des doses de folliculine de l'ordre de 1 000 µg/ml ne provoquent pas d'altérations dégénératives sur les cellules épithéliales utéro-vaginales du Rat. De même un œstrogène hydrosoluble, le sel sodique de l'acide déshydrodoïsynolique, est encore capable de provoquer une migration cellulaire à partir d'une ébauche gonadique de Poulet à cette même dose de 1 000 µg/ml (WOLFF et HAFFEN, 1952). Enfin un contact direct avec des gouttelettes de benzoate d'œstradiol en solution huileuse provoque également une prolifération cellulaire de l'ébauche gonadique sans entraîner l'apparition de phénomènes dégénératifs. Des doses aussi élevées n'ont pas été expérimentées avec les autres hormones, mais 80 µg/ml de progestérone (KULLANDER et KALLEN, 1959) ou 100 µg/ml de testostérone (ROTA, 1958) ont simplement augmenté les effets de ces hormones respectives dans le sens où elles agissaient aux plus faibles doses.

— Peut-on enfin incriminer le rôle du solvant dans cette uniformité de réactivité des cellules néoplasiques vis-à-vis des hormones sexuelles ? Le solvant pourrait en effet inhiber ou inactiver certaines des propriétés de l'hormone qu'il solubilise, mais, comme nous l'avons précédemment rapporté, l'activité biologique de la solution alcoolique d'œstrogène n'est pas modifiée chez l'animal. On peut encore penser à une activité propre du solvant, mais la comparaison des cultures témoins et des cultures de contrôle contenant le solvant pur ne fait état que de variations non significatives. Il faut

d'ailleurs signaler que les solutions alcooliques ont été utilisées par d'autres auteurs, qui concluent également à l'inactivité de la concentration de ce solvant dans le milieu (KULLANDER et KALLEN, 1959 ; JAMBON et FLANDRE, 1959). Cependant FRANKLIN (1960) signale, comme nous l'avons également constaté, une prolifération des cultures de contrôle légèrement supérieure à celle des cultures témoins. Si donc l'alcool a une certaine activité, elle se manifeste en sens inverse de celle que nous étudions et n'interfère en aucun cas dans les résultats. SMITH, LUMMIS et GRADY (1959), qui ont étudié les doses létales d'un grand nombre de substances chimiques sur les cellules K.B., ont d'ailleurs montré que les solvants, et en particulier l'éthanol, ne deviennent toxiques que pour des doses nettement supérieures à 5 000 µg/ml. Enfin les auteurs japonais (KAWADA, 1959 ; SOMEYA, 1960), qui utilisent comme solvants des solutions salines tamponnées, obtiennent des résultats superposables aux nôtres.

Cette étude critique de nos méthodes expérimentales nous permet donc de penser que les résultats obtenus sur les cellules HeLa et K.B. par l'action des hormones génitales sont liés aux propriétés spécifiques de ces hormones et non à des excès de concentration ou à l'influence du solvant.

II. — S'il n'existe, à notre connaissance, aucun travail précis concernant l'activité hormonale sur la souche K.B., quelques auteurs ont par contre étudié, parallèlement à nos propres recherches, l'action des hormones génitales sur la souche HeLa. Nous allons analyser et comparer ces résultats pour chaque hormone.

— L'*œstradiol* a été plus particulièrement utilisé par KAWADA (1959) à des doses variant de 0,0003 à 0,03 µg/ml. Sur des cultures HeLa de quarante-huit

heures, la plus faible dose, appréciée par comptage des noyaux à l'hématimètre selon la méthode de SANFORD (1951), stimule la croissance cellulaire dans la proportion de + 15 %, la dose moyenne est inactive, la dose la plus élevée est inhibitrice (— 10 %).

L'auteur a également étudié l'action d'un œstrogène de synthèse, le robal [1], dont le comportement est sensiblement identique puisque l'activation est de + 15 % à 0,0003 µg/ml, de + 10 % à 0,003 µg/ml et nulle pour 0,03 µg/ml. Ces cultures de deux jours montrent donc une stimulation cellulaire pour les faibles doses, une inhibition de croissance pour les doses plus fortes qui se rapprochent de notre dose minimum : 0,2 µg/ml. Des cultures prolongées de quatre et même sept jours, réalisées par l'auteur, confirment ces résultats. FRANKLIN (1960) utilise des doses variant entre 0,1 et 100 µg/ml, qui sont donc identiques aux nôtres, et obtient des effets parfaitement superposables à ceux que nous avons décrits, soit une légère souffrance cellulaire pour les doses de 0,1 et 1 µg/ml, une très forte inhibition pour 10 µg/ml et une destruction de la culture pour 100 µg/ml. Ces résultats viennent confirmer le pouvoir inhibiteur de l'œstrogène qui serait donc précédé, au-dessous de la concentration de 0,01 µg/ml environ, d'un faible pouvoir stimulant.

— La *progestérone* a été également utilisée sur la souche HeLa par KAWADA avec des concentrations variant de 0,03 à 3 µg/ml. Ces trois concentrations ont un effet favorable sensiblement égal sur des cultures de quarante-huit heures qui est de l'ordre de 10 %. FRANKLIN retrouve cet effet favorable pour 0,1 et 1 µg/ml, tandis que la dose de 10 µg/ml est légèrement inhibitrice et la dose de 100 µg/ml fortement destructive. Ici encore, il n'y a guère de différence entre les résul-

(1) 44' diacetoxy $\alpha$, $\beta$ diethylbibenzyl (Chugaï Pharmaceut. C°).

tats si ce n'est que nous avons rencontré un pouvoir inhibiteur plus précoce de l'hormone et un effet nul au-dessous de 5 µg/ml. Les doses plus faibles seraient donc, ici encore, activatrices.

— La *testostérone* enfin est employée par KAWADA aux concentrations de 0,006 à 0,6 µg/ml. Si l'effet est favorable aux plus faibles doses (+ 30 et + 8 %), l'hormone est déjà inhibitrice pour 0,6 µg/ml (— 8 %), comme nous l'avons d'ailleurs rapporté. SOMEYA (1960) reprend l'action de la testostérone dans les mêmes conditions et retrouve des résultats identiques, les taux d'activité sur la croissance étant respectivement de + 2 %, — 5 %, — 8 % et — 27 % pour 0,01; 0,1; 1 et 10 µg par millilitre. Enfin FRANKLIN (1960) compare les effets de la testostérone à ceux de l'œstradiol, car il retrouve, pour l'hormone mâle, une inhibition de croissance qui s'accentue entre 0,1 et 10 µg/ml pour devenir pratiquement totale pour 100 µg/ml.

Ces relations étroites avec les résultats des divers auteurs nous permettent de dire que, d'une façon générale, les très faibles doses hormonales sont légèrement favorisantes pour la croissance des cellules HeLa, tandis que les doses plus élevées se révèlent fortement inhibitrices. Ce pouvoir inhibiteur est particulièrement élevé pour l'œstradiol où il apparaît dès le 1/100 de µg par millilitre, il est également net pour la testostérone dès le 1/10 de µg/ml, il apparaît plus tardivement pour la progestérone où il ne se manifeste qu'à partir de 5 µg/ml de milieu de culture.

Nous pouvons dès lors affirmer que des doses supraphysiologiques d'hormone génitale altèrent fortement la croissance des cellules cancéreuses HeLa, d'une part, et que, d'autre part, on constate une identité d'action des hormones mâle et femelle qui s'oppose à leur antagonisme classique.

III. — L'uniformité d'action des trois hormones génitales vis-à-vis de la souche HeLa correspond-elle aux faits préalablement établis concernant l'activité de ces principes hormonaux aussi bien *in vivo* que *in vitro* ? Retrouve-t-on, en particulier, de façon constante, l'action inhibitrice constatée sur cette souche carcinomateuse ? C'est ce que nous allons maintenant envisager.

1° *Etude* in vivo

— En dehors de l'action morphogène classique de l'hormone femelle à la fois sur les organes embryonnaires et les récepteurs génitaux impubères ou adultes, l'*œstradiol* est fréquemment actif sur les processus tumoraux et, dans les deux cas, cette action paraît favoriser les phénomènes de prolifération cellulaire. Depuis les travaux classiques de Lacassagne (1932) sur le cancer mammaire de la Souris, de nombreuses recherches ont montré que l'administration prolongée d'œstrogènes entraînait l'apparition de diverses tumeurs conjonctives de nature bénigne ou maligne. C'est ainsi qu'à côté de simples hyperplasies de la glande (Iversen, 1958 ; Ahren et Etienne, 1958) l'œstrogène induit très souvent chez la Souris des tumeurs mammaires (Barbieri, Olivi et Sacro, 1958 ; Richardson *et* collaborateurs, 1957). Cependant, l'influence du terrain est importante et certaines races de Souris (Pullinger, 1957), ou la résistance d'animaux comme le Singe (Gischickter et Hartman, 1959) diminuent l'incidence de ces néoplasies qui sont de toute façon hormono-dépendantes, comme le démontrent, entre autres, Huggins, Brizaerelli et Sutton (1959). Les tumeurs ovariennes se développent aussi fréquemment sous l'action de la surcharge œstrogénique, ces tumeurs apparaissent aussi bien avec le synœstrol chez le Cobaye (Podilchak et Kalynyuk, 1959) qu'avec le stilbœstrol chez le Lapin (Sommers et Meissner, 1957 ; Meissner, Sommers et Sherman, 1957) ou le Chien (Jabara, 1959). Les œs-

trogènes induisent, avec la même facilité, des tumeurs des éléments endocrines du testicule (Trentin et Gardner, 1958 ; Shimkin et Canter, 1960) ou de la glande surrénale (Imai, 1957 ; Iglesias et Mardones, 1958). En dehors de cette tumorisation des glandes endocrines, les œstrogènes peuvent provoquer ou accélérer la tumorisation de la vessie (Ragaglia et Marinucci, 1959), du foie (Konoplev, 1959), de la peau (Picco, Somaglino et Lasi, 1959). Il faut enfin citer les classiques tumeurs rénales du Hamster induites par le stilbœstrol (Franks et Chesterman, 1957 ; Kirkman, 1957 ; Dontenwill et Eder, 1959 ; Polkina, 1959, et McGregor et Putch, 1960). Les nombreuses recherches que nous avons cité ne sont qu'un très faible reflet des travaux qui démontrent ce grand pouvoir tumorisant des œstrogènes et, dans le cas du col utérin d'où la souche HeLa est née, nous insisterons sur cette action. En effet, Stein-Werbloswky (1960) a montré que l'apparition des néoplasies du col utérin chez le Rat qui reçoit des instillations intravaginales de benzopyrène, était en relation avec le cycle œstral de l'animal ou l'administration simultanée d'œstrogènes (Picco, Somaglino et Cuzzupoli, 1959). Gardner (1954, 1957, 1959 1, 1959 2) a d'ailleurs étudié l'action isolée des œstrogènes en injections, implantations ou instillations intravaginales et montré la fréquence des aspects tumoraux obtenus au niveau du col et du vagin de la Souris.

Tous ces faits nous montrent donc que les œstrogènes exercent une action favorable sur les tissus néoplasiques *in vivo*. Il existe cependant quelques cas où l'hormone paraît défavorable à la croissance des tissus cancéreux ; mais, dans tous ces cas, il s'agit de croissance de tumeurs transplantées. Ainsi les sarcomes mammaires transplantables D.R.V. et R.M.K.- I ont une croissance retardée chez les Souris recevant des œstrogènes de synthèse, alors que cette croissance est rapide chez

les animaux castrés (Jacob et Huseby, 1959 ; Lagova, 1960). De même le développement du sarcome I.A.K.S. est fortement inhibé chez la Souris sous l'action de l'œstradiol (Goldberg, Fregier et Grossman, 1959). Le même effet est constaté par Fels (1958) pour la croissance d'une tumeur ovarienne intrasplénique greffée chez le Rat. D'autre part, Browning, White et Sadler (1959) retrouvent ce retard de croissance dû à l'œstrogène dans le développement de greffes intra-oculaires de tumeurs cortico-surrénales chez la Souris. Il convient de remarquer que ces effets, considérés comme défavorables, sont toujours liés au développement plus ou moins rapide de greffons tumoraux et on peut penser, dans ce cas, que l'hormone œstrogénique agit plus sur l'organisme qui reçoit la greffe que sur le tissu tumoral lui-même. En effet, si l'œstrogène tend à retarder la prise du greffon, il ne s'oppose plus, secondairement, à son développement. Ces faits nous montrent que, d'une façon générale, les œstrogènes ont une action franchement favorable et le plus souvent inductrice vis-à-vis des processus tumoraux se développant chez l'animal vivant.

— La *progestérone*, beaucoup moins étudiée à l'état isolé, présente *in vivo* une activité assez voisine de celle de l'œstradiol et son action favorable se retrouve déjà dans la stimulation des glandes mammaires de la Souris (Scowen, Hardfield et Donath, 1959). Mais elle est aussi capable d'influencer chez cet animal le développement de l'adénocarcinome d'Ehrlich puisqu'elle diminue de moitié l'apparition de la tumeur et provoque ensuite une activation très nette de la croissance tumorale (Rio, 1957 [1], 1957 [2]). La progestérone est également très active sur le développement de la tumeur de Guérin chez le Rat femelle (Kubesar-Gergely et Fekete, 1960) ainsi que sur la croissance de greffes ovariennes intrasplèniques de Rats castrés (Colonna, 1958). La

progestérone stimule enfin le développement, chez la Souris, de greffes de tumeurs cortico-surrénales (Iglesias et Mardones, 1958). Cependant l'hormone lutéinique peut également manifester une action défavorable sur les processus néoplasiques et c'est ainsi que Rio (1957 a) a constaté qu'elle inhibait totalement, chez le Rat albinos traité par le méthylcholantrène, l'apparition de sarcomes sous-cutanés qui sont fréquents chez les animaux témoins. Dans le même sens, elle inhibe l'apparition chez le Lapin de tumeurs vésicales induites par l'injection uréthrale de benzopyrène (Ragaglia et Marinucci, 1959). Enfin la progestérone exerce une action défavorable sur la croissance en même temps qu'un important retard dans l'apparition des tumeurs cortico-surrénaliennes greffées dans l'œil de la Souris (Browning, White et Sadler, 1959). Mais, qu'il s'agisse d'action favorable ou défavorable, la progestérone agit ici dans des proportions assez faibles et toujours sur des tumeurs transplantées ou créées par un autre agent cancérigène. Son action propre est donc assez minime et variable.

— La *testostérone* a, par contre, une action essentiellement défavorable sur la plupart des processus tumoraux et c'est elle que nous envisagerons tout d'abord. C'est ainsi que Wolfson (1958) montre l'importante diminution de la fréquence des néoplasies mammaires spontanées, chez les races de Souris sensibles, par l'administration de testostérone. Cette propriété est partagée par la totalité des produits androgènes utilisés. Une action défavorable sur la croissance du fibro-adénome mammaire du Rat femelle est également soulignée par Glenn et ses collaborateurs (1959). Le propionate de testostérone inhibe également les néoplasies vaginales induites chez la Souris par instillation d'un carbure cancérigène (Wolfson, 1960). L'hormone mâle provoque aussi la dégénérescence des tumeurs ovariennes intra-

spléniques greffées chez le Rat (Fels, 1958) et elle inhibe la croissance de tumeurs surrénales transplantées dans l'œil de la Souris (Browning et coll., 1959). L'action défavorable des androgènes s'exerce d'autre part sur les formations tumorales les plus diverses : sur la croissance d'un cancer expérimental de la vessie du Lapin (Ragaglia et Marinucci, 1959), sur le développement de cellules carcinomateuses ascitiques d'Ehrlich chez la Souris (Ahlstrom et Stormby, 1958 ; Ahlstrom et Johnsson, 1960), sur l'hépatome du Rat (Konoplev, 1959) ou les leucémies du Rat (Rudali, Jullien et Juliard, 1959 ; Violante et coll., 1958-1959).

Cependant la testostérone peut exercer parfois un effet favorable sur le développement de certaines formations. Elle provoquerait ainsi l'hyperplasie des conduits de la glande mammaire du Rat castré et hypophysectomisé (Ahren et Etienne, 1959) ; mais surtout, elle augmenterait nettement la croissance d'un adénocarcinome transplantable du Rat : R.M.K.-1 (Lacova, 1960). Elle provoquerait d'autre part chez le Hamster, au même titre que l'œstrogène, des tumeurs rénales, endométriales, et des basiliomes du flanc (Kirkman, 1957) ; cependant l'importance de ces tumeurs n'est pas retrouvée par Rivière, Chouroulinkov et Guérin (1960). Pour Herning (1958), les Rats développent des tumeurs ovariennes s'ils sont exposés longtemps aux injections de testostérone, mais il pense que ce fait est dû à la conversion de la testostérone en œstrogène dans l'organisme. C'est la raison qui est également invoquée par Sokolowsky (1959) dans la production de lésions du col utérin de la Souris femelle sous l'action du propionate de testostérone.

En conclusion, l'hormone mâle se révèle donc essentiellement inhibitrice sur les processus tumoraux malgré l'existence de quelques effets favorables.

### 2° *Etude* in vitro

Les faits concernant l'action des trois hormones génitales *in vitro* se révèlent différents suivant que l'on examine cette action sur des cultures organotypiques ou histiotypiques, d'une part, et sur des souches cellulaires d'autre part.

a) *Cultures histiotypiques ou organotypiques.*

— Nous avons exposé précédemment l'action favorable ou défavorable que les *œstrogènes* peuvent exercer *in vitro* sur les tissus normaux embryonnaires ou adultes, nous ne reviendrons pas ici sur ces faits pour nous attacher plus particulièrement aux recherches qui concernent l'action des œstrogènes sur les récepteurs génitaux femelles : utérus et vagin, puisque la souche HeLa tire son origine d'une tumeur du col utérin. On sait en effet que la folliculine est responsable *in vivo* de la prolifération et de la kératinisation de l'épithélium vaginal, et de nombreux auteurs ont tenté de retrouver cet effet sur des explants *in vitro*. Ainsi Rosenthal (1934) et Emmens et Ludford (1940) font agir des œstrogènes sur des explants de vagin de Rat sans résultat. Sur ce même matériel, Verne (1935) et Dux (1941) confirment ces faits, mais obtiennent une réponse positive lorsque l'hormone est apportée sous forme de sérum d'animal traité aux œstrogènes. Ces recherches paraissaient conclure à une inactivité de l'hormone pure qui doit subir une transformation dans l'organisme pour être rendue active. Cependant l'action directe et favorisante des œstrogènes est mise en évidence par Gaillard (1942) sur l'utérus et la vésicule séminale de la Souris, puis par Coujard (1943) sur le vagin du Cobaye et du Rat, et surtout par Hardy, Biggers et Claringbold (1953) ; Kahn (1954 1, 1954 2) qui obtiennent une action favorisante directe de l'œstradiol sur la kératinisation de l'épithélium vaginal de la Sou-

ris et du Rat, résultats largement confirmés par Biggers, Claringbold et Hardy en 1956. On peut alors affirmer une action directe favorable des œstrogènes au niveau des récepteurs du tractus génital femelle. Il faut également signaler qu'au niveau de la glande mammaire, l'œstradiol a une action légèrement stimulante sur les formations épithéliales (Lasfargues, 1960). Nous allons retrouver ce même caractère de l'hormone lorsqu'il s'agit de tissus cancéreux et nous rappellerons que Monesi (1956) obtient un effet favorable de l'ordre de 400 % lorsqu'il cultive ses explants d'adénocarcinome d'Ehrlich en présence de 50 µg/ml d'œstradiol, résultats confirmés par Otani (1959). Vis-à-vis des tumeurs expérimentales, l'œstradiol, qui paraît inactif à 15 µg/ml sur la croissance des fragments de tumeurs ovariennes intraspléniques du Rat (Kullander et Kallen, 1959), est par contre favorable au développement *in vitro* de la tumeur rénale du Hamster, créée par administration prolongée à l'animal de cette même hormone.

— L'effet de la *progestérone* est moins évident. Pour Lasfargues et Murray (1959) elle inhibe le développement des cultures de glandes mammaires de Souris. Elle active cependant fortement la croissance de l'adénocarcinome spontané de cet animal (Monesi, 1956), aux doses faibles, car ce pouvoir disparaît dès 50 µg/ml, comme le retrouve Otani (1959). Pour Kullander et Kallen (1959) cette hormone paraît inactive, à des concentrations supérieures, sur des explants de tumeurs ovariennes intraspléniques greffées chez le Rat castré.

— Quant à la *testostérone*, elle a été rarement utilisée *in vitro* sur des récepteurs féminins et l'on connaît donc mal son action. Il semble toutefois, d'après les travaux de Martin (1959), que son activité soit très faible sinon nulle sur la croissance d'explants de vagin de Souris. Par contre, Monesi (1956), Rota (1958)

constatent l'effet inhibiteur marqué de cette hormone sur l'adénocarcinome d'Ehrlich, effet qui est de l'ordre de 60 % pour les doses élevées (50 µg/ml). Cet effet inhibiteur est également remarqué sur les cultures de tumeurs ovariennes intrasplèniques du Rat (Kullander et Kallen, 1959).

L'étude de ces quelques recherches, effectuées *in vitro*, sur l'action des hormones génitales au niveau de cultures tissulaires organotypiques ou histiotypiques, nous permet de conclure à une similitude presque rigoureuse de ces résultats avec ceux déjà observés *in vivo*. Nous retrouvons toujours jusqu'ici l'activité généralement stimulante de l'œstradiol, variable de la progestérone, défavorable de la testostérone.

b) *Les cultures monotypiques.*

Par contre, dès que nous observons les réactions des souches cellulaires devant ces principes hormonaux, nous constatons qu'elles sont identiques, quelle que soit l'hormone, et se résument en un effet inhibiteur.

Nous avons montré précédemment que ces faits étaient parfaitement établis, par de nombreux auteurs, pour la souche HeLa. Nos résultats personnels aboutissent à des conclusions analogues pour la souche K.B., et Kawada (1959) observe le même type de réactivité pour la croissance des cellules du sarcome de Yoshida.

IV. — L'ensemble des faits que nous venons de rapporter permet donc d'établir qu'il existe, tout au moins en partie, une certaine divergence entre l'activité générale des hormones génitales et celle qu'elles manifestent au niveau des souches tumorales. En dehors de la progestérone et de la testostérone, dont les effets demeurent sensiblement identiques quelles que soient leurs conditions d'action, l'œstradiol apparaît en effet comme une substance inactive ou fortement inhibitrice sur la croissance des cellules carcinomateuses, alors que l'ac-

tion classiquement favorable de cette hormone vient d'être largement démontrée. Comment peut-on expliquer ces faits ?

1° Dans le milieu de culture, cellule carcinomateuse et hormone sont les seuls éléments en présence, et tous les faits que nous pourrons constater résulteront toujours de l'action directe et unique de cette hormone sur la cellule. *In vivo*, au contraire, l'organisme dispose d'un nombre considérable de moyens pour régler, modifier ou détruire l'hormone entre le moment où il la produit et celui où elle peut agir. C'est ainsi que l'on connaît le rôle fondamental du foie soit dans la conjugaison (Fishman, 1951), soit dans la destruction de l'hormone (Roberts et Szego, 1953), pour laquelle les estérases spécifiques ont été mises en évidence (Dirschel et Kruskemper, 1953). D'autre part, en dehors des troubles que peut provoquer la surcharge d'une hormone sur la régulation du système endocrinien, on sait aujourd'hui, de façon certaine, que l'organisme dispose de puissants mécanismes enzymatiques capables de rétablir l'équilibre hormonal. C'est ainsi que l'œstradiol peut être synthétisé à partir de la testostérone et que ces deux hormones sexuelles peuvent être utilisées dans la synthèse des hormones du cortex surrénal (Yudaev et Druzhinina, 1958), ces stéroïdes surrénaliens pouvant à leur tour agir sur les processus tumoraux : la cortisone inhibe en effet fortement la croissance de plusieurs tumeurs transplantables du Rat (Garcia, Vergara et Gosic, 1958 ; Kowalevsky et McEachern, 1959). D'autre part, l'apport exagéré ou la privation d'une hormone entraîne souvent des modifications inverses de l'hormone antagoniste, d'où une série de manifestations secondaires. L'importance de ce que l'on a appelé la « balance hormonale » est illustrée par les travaux de Goldie et ses collaborateurs (1959) qui transplantent des cellules tumorales ascitiques chez des Souris recevant des hormones génitales : la croissance

de la néoplasie est nettement accrue chez les Souris recevant alternativement œstrogènes et androgènes alors qu'elle demeure modérée chez les animaux traités avec l'une ou l'autre hormone. Enfin l'organisme peut disposer localement de moyens de défense particuliers qui sont encore mal connus. C'est ainsi que l'on a extrait, du stroma périphérique de l'adénocarcinome d'Ehrlich, une substance qui, injectée dans la tumeur, inhibe son développement en bloquant les divisions cellulaires (Nishimura et coll., 1958).

Ces quelques exemples ne donnent qu'une faible idée des nombreux facteurs qui interviennent dans une activité hormonale *in vivo*, dont le résultat ne pourra donc pas être rapporté uniquement à l'hormone en cause.

2° En culture d'organe, par contre, où les possibilités d'interactions se réduisent à des relations tissulaires, on pourra déjà mieux juger de la spécificité hormonale. Or nous avons souligné le parallélisme étroit qui existe dans les réactivités aux hormones de certains tissus, qu'ils soient isolés *in vitro* ou en place sur l'animal. Il faut donc penser que le stroma constitue le support essentiel du mécanisme de l'action hormonale et il est aujourd'hui classique de considérer le chorion comme le relai actif entre hormone et cellule. Des coupes de tissu ovarien, capables d'élaborer de l'œstradiol marqué à partir de testostérone marquée ajoutée dans le milieu de culture, sont un exemple de la présence, dans le stroma, de systèmes enzymatiques complexes dont le fonctionnement est autonome (Bacget et coll., 1956 ; Engel, 1957 ; Hollander et Hollander, 1958). Le rôle fondamental du chorion dans le développement cellulaire est encore plus clairement mis en évidence par Lasfargues (1957-1961). L'auteur montre que l'addition d'hormone mammotropique n'est pas capable de faire apparaître les gouttelettes caractéristiques de la fonction

sécrétoire au niveau de l'épithélium mammaire de la Souris, par contre, dès que l'on ajoute à la culture un fragment de tissu adipeux homologue, les cellules épithéliales s'enrichissent en gouttelettes lipidiques. Ce travail, qui démontre la nécessité de la présence du stroma pour que l'action hormonale se manifeste, vient signifier clairement que l'hormone peut également agir en activant un système enzymatique qui, par la suite, agira pour son propre compte. Ces faits, maintes fois rapportés, ont été notamment bien mis en évidence par KNOX et AUERBACH (1955) qui ont observé les variations de la tryptophane - oxydase du Rat parallèlement à l'administration de cortisone.

3° Cependant, en culture histiotypique, il paraît difficile d'invoquer l'influence, sur la nappe épithéliale émigrée, de la faible partie conjonctive de l'explant. Nous avons pourtant montré que la réactivité hormonale de ces éléments demeure en général semblable à ce qu'elle est *in vivo*. Il faut donc, au delà du rôle indiscutable du stroma, admettre que l'activité hormonale peut se manifester directement au niveau de la cellule. Si donc, par un système enzymatique donné, l'hormone peut être transformée en une substance véritablement active sur la cellule, elle doit pouvoir, indépendamment, agir directement sur cette cellule.

4° C'est précisément l'intérêt de la culture monotypique de permettre l'étude de ce pouvoir direct de l'hormone et de l'isoler de son action globale. On conçoit alors qu'en diaphragmant l'activité hormonale au seul échelon cellulaire, et en privant ainsi les cellules de tous leurs moyens connexes, on peut voir apparaître des réactions cellulaires jusqu'alors masquées, et apprécier, de ce fait, une réactivité hormonale inhabituelle. C'est ainsi, notamment, qu'ALGARD (1960) observe nettement l'opposition qui peut exister entre l'influence d'une hormone sur les cultures de tumeur rénale du

Hamster induite par les androgènes selon le type de culture utilisé. S'il cultive des fragments de la tumeur, il s'aperçoit qu'il ne peut maintenir les éléments en vie qu'à la condition d'ajouter au milieu des concentrations importantes de stilbœstrol. Par contre, les cellules tumorales isolées survivent normalement dans le milieu, avec ou sans stilbœstrol. L'hormono-dépendance de la tumeur *in vivo* s'est donc retrouvée *in vitro* sur le fragment organisé, mais elle a disparu dès que l'on s'est adressé à la cellule isolée.

— *Dans le cas de la souche K.B.*

Le graphique de la figure 13, qui résume l'activité des trois hormones sexuelles sur cette souche, nous montre en premier lieu le parallélisme d'action des trois principes hormonaux, parallélisme extrêmement étroit puisque les trois courbes sont pratiquement confondues. Ce graphique permet ensuite d'analyser cette action commune des hormones génitales en distinguant trois étapes : une première étape correspond à la présence, dans le milieu de culture, d'une concentration hormonale inférieure à 10 µg/ml et elle se traduit par l'indifférence de la cellule K.B. à la présence du principe actif ; une deuxième étape, que l'on peut qualifier d'active, et où la variation très faible de concentration de l'hormone (10 à 50 µg/ml) permet d'assister à la mort rapide et brutale de la cellule carcinomateuse : enfin une dernière étape, au delà de 50 µg/ml, où toute croissance cellulaire est impossible. Que conclure de ces faits ?

*a)* L'indifférence de la cellule K.B. aux trois hormones n'est pas faite pour nous surprendre. De par son origine, sur laquelle nous ne reviendrons pas, la souche K.B. n'a pas de raison particulière de répondre à une stimulation hormonale et elle représente pour nous la cellule carcinomateuse banale, étrangère à tout processus endocrinien.

*b)* Par contre, la mortalité cellulaire survenant pour une si faible variation de concentration du principe actif, et cela identiquement pour les trois hormones, laisse à penser que les substances hormonales se sont comportées toutes trois comme un même corps toxique qui a brutalement rompu la barrière de défense de la cellule. Or une seule chose est commune à ces hormones, c'est le noyau stérolique dont elles tirent, toutes trois, leur origine. En faveur de cette hypothèse, qui tend à ramener cette action hormonale à l'agressivité d'un système moléculaire, parlent les travaux de LETTRE et FLANDRE (1959). Ces auteurs cultivent des cellules HeLa et des cellules d'une autre souche carcinomateuse : la souche H.E.P. n° 2, en présence de quatre dérivés du cholestérol : des cristaux de ces substances sont placés à un pôle de la culture où ils agissent sur les cellules proches par diffusion dans le milieu, tandis que l'autre pôle sert de témoin. Sans pouvoir préciser de ce fait les doses de ces précurseurs hormonaux reçus par les cellules, les auteurs constatent une activité inhibitrice marquée des quatre dérivés, surtout du 6 aza Δ 3-5 cholestadiène. Il faut d'ailleurs remarquer que FRANKLIN (1960) signalait, sur les cellules cancéreuses HeLa, une action identique des hormones génitales et de divers stéroïdes. JAMBON et FLANDRE (1959) ont d'autre part montré une action toxique de plusieurs dérivés cortisoniques pour la dose de 5 µg/ml vis-à-vis des cellules isolées. Il faut donc conclure, devant ces faits, à une sensibilité particulière de la cellule K.B. aux stéroïdes entre des doses bien définies, sensibilité qui se traduit par une toxicité brutale et complète.

*c)* Au delà de 50 µg/ml de milieu de culture, les hormones génitales, non seulement empêchent la croissance, mais encore provoquent la mort de la souche K.B. Or il est surprenant de constater que cette même dose accroît de 400 % la zone de migration cellulaire à partir d'explants d'adénocarcinome d'EHRLICH (MONESI,

1956). La preuve est ainsi faite du rôle fondamental, dans la protection de la cellule, du contact avec les éléments voisins, dont la cohésion augmente considérablement sa résistance aux agents toxiques.

Si l'on peut généraliser à la cellule cancéreuse banale les résultats mis en évidence sur la souche K.B., il faut donc conclure que la stimulation directe des hormones génitales n'existe pas à son niveau, mais peut se traduire, dans des conditions d'isolement poussé, par un pouvoir d'inhibition de croissance non spécifique. Il existe, sur ce plan, une différence de réactivité considérable entre la cellule isolée et la cellule appartenant à une lame cellulaire.

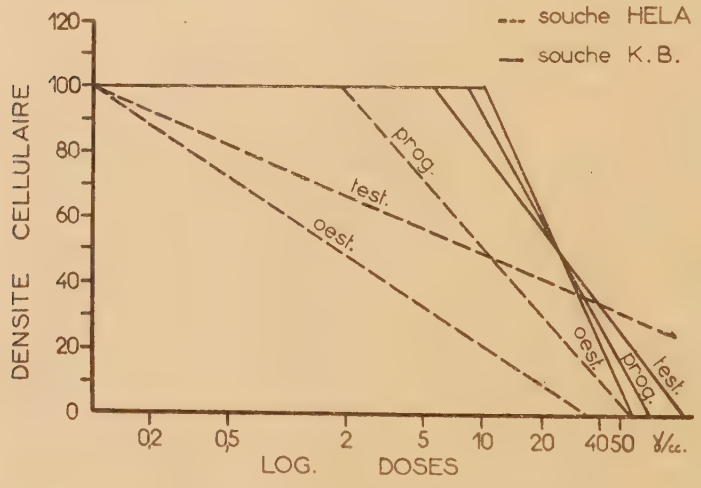


FIGURE 13.

*Action comparée des trois hormones génitales sur les deux souches cellulaires HeLa et K.B. en ramenant les origines des courbes au point contrôle* 100.

— *Dans le cas de la souche HeLa.*

La même analyse des résultats obtenus avec la cellule HeLa, dont on a souligné, à plusieurs reprises, les rapports étroits avec la cellule K.B., nous conduit vers des conclusions plus séduisantes.

*a)* On peut lui appliquer en effet les conclusions générales émises à propos de la cellule K.B., soit l'existence d'une disparition complète au delà de 50 µg/ml, dose à partir de laquelle les hormones génitales se comportent comme des agents toxiques banaux.

*b)* Mais, au-dessous de cette dose, nous observons une spécificité de l'action hormonale qui prouve tout d'abord qu'il existe véritablement au niveau de la cellule, et ce qui est plus important encore au niveau de la cellule carcinomateuse, une sensibilité spécifique qui peut trouver sa justification dans l'origine génitale de la souche HeLa que nous avons soulignée. Plus que la preuve d'une action hormonale directe et spécifique à l'échelon cellulaire, la cellule HeLa démontre que la cancérisation n'a pas altéré la sensibilité à l'imprégnation hormonale que possédait la cellule normale correspondante.

*c)* Cette spécificité d'activité s'extériorise non seulement par les effets des hormones dès les plus faibles concentrations et dont l'amplitude accompagne la variation des doses, mais encore par une différence d'activité en fonction de l'hormone considérée, comme le montre nettement la progestérone par rapport à l'œstradiol et à la testostérone.

*d)* La nature de cette action hormonale, du moins entre les doses que nous avons utilisées, reste le fait capital. En dehors de la progestérone, dont le retard d'activité peut s'expliquer par le fait que cette hormone agit le plus souvent après une imprégnation folliculinique, il est remarquable de constater une relation étroite entre les activités respectives de l'œstradiol et de la testostérone. Si l'effet de cette dernière hormone paraît naturel, l'activité de l'œstradiol est au contraire paradoxale. Or, nous y reviendrons ultérieurement, il existe, pour les plus faibles concentrations, un véritable anta-

gonisme hormonal au niveau de la cellule HeLa. On peut donc penser que ces résultats traduisent, dans les limites de nos doses, la prédisposition de cette cellule carcinomateuse, de par sa réceptivité particulière à l'hormone, à la toxicité de doses élevées.

L'étude de la souche HeLa nous permet donc de confirmer l'action directe, indiscutable des hormones sexuelles au niveau de la cellule carcinomateuse et de souligner, pour la cellule cancéreuse d'origine génitale, une action hormonale spécifique se faisant de plus dans le sens d'une inhibition, c'est-à-dire, dans le cas de l'œstradiol, dans un sens opposé aux réactions cellulaires normales.

— L'intérêt de cette réceptivité particulière de la cellule HeLa ne devient apparent que dans la mesure où la toxicité hormonale pour la cellule normale est inférieure ou au moins égale à celle que nous avons trouvée sur la souche K.B. Or, bien que nous ne possédions pas de souches cellulaires humaines épithéliales et conjonctives qui permettraient une comparaison directe des réceptivités hormonales, il semble bien que la cellule normale soit également très vite sensible lorsqu'on l'isole, à la toxicité des hormones génitales. Ainsi, Lettre et Flandre (1959) obtenaient sur le fibroblaste des altérations cellulaires assez comparables à celles obtenues sur les souches cellulaires lorsqu'ils étudiaient l'action des dérivés du cholestérol. Kawada (1960) met en évidence sur ce même matériel le rôle inhibiteur des hormones génitales déjà constaté en 1942 par von Mollendorf. Il faut cependant remarquer que les fibroblastes se révèlent beaucoup plus sensibles que les cellules épithéliales normales, à l'action des stéroïdes en général. Cet effet a d'ailleurs été utilisé par Grossfield et Ragan (1954-1958) pour obtenir des cultures pures de nature strictement épithéliale. Malgré ces faits, les travaux de Bimes, Planel et David (1961), qui ont utilisé la dose de 20 µg/ml d'œstradiol sur des cultures

de fibroblastes utérins humains et d'épithélium utérin de Rat, montrent un effet légèrement favorable de l'hormone femelle. Otani (1959), Grossfield (1958 2) ont essayé de comparer l'action des hormones génitales sur des tissus normaux et cancéreux, l'un du point de vue de la croissance, l'autre en explorant le métabolisme cellulaire de deux souches : fibroblastique (L) et cancéreuse (H. Ep. 2). Leurs résultats sont en réalité peu significatifs et ne permettent pas l'interprétation.

On peut cependant espérer la possibilité d'une application thérapeutique lorsque l'on pense que, d'une part, le tissu cellulaire sous-cutané est capable de supporter pendant des mois, sans réaction, les doses énormes que représente un pellet hormonal et que, d'autre part, l'administration intratumorale de testostérone paraît faire régresser des nodules cancéreux du sein, de la vulve, comme le rapporte Walther (1958-1959).

— Bien que ces faits ne soient pas le résultat de nos propres recherches, il paraît intéressant de signaler l'effet antagoniste des hormones sexuelles sur la croissance cellulaire, effet qui a pu être mis en évidence sur la souche HeLa par les auteurs japonais en utilisant des doses inférieures aux nôtres. Cet antagonisme permet en effet d'affirmer, comme nous l'avons dit précédemment, que l'action des hormones génitales au niveau de la cellule HeLa est véritablement spécifique et comparable, à ces faibles doses, à la réceptivité de la cellule normale du col utérin.

C'est ainsi que Kawada a le premier montré en 1959 que l'addition simultanée de 0,003 µg/ml d'œstradiol à 0,6 µg/ml de testostérone potentialisait fortement l'activité de l'hormone mâle dont le pouvoir inhibiteur passait de 8 à 40 %. Someya (1960) a repris alors sur cette même souche HeLa ce problème particulier de l'antagonisme cellulaire et il a constaté que l'action fortement inhibitrice de 10 µg/ml de testostérone s'an-

nulait si on lui associait 0,3 µg/ml d'œstradiol. Un antagonisme semblable était signalé par FRANKLIN (1960) entre la prednisolone et les hormones génitales, tandis qu'une synergie d'inhibition était au contraire remarquée par TAKAOKA et ses collaborateurs (1960).

V. — Quel est, enfin, le mécanisme intime de cette action inhibitrice globale des hormones génitales sur la croissance cellulaire ?

Il est bien évident que ce délicat problème garde toute sa complexité et qu'il ne nous appartient pas ici de le résoudre. Cependant, l'examen de l'index cinétique de nos cultures traitées, qui, au départ, n'avait d'autre but que de venir confirmer les résultats obtenus par le calcul de la densité cellulaire, nous a justement permis de découvrir un antagonisme hormonal. Cet antagonisme, dont nous venons de montrer l'existence sur la croissance cellulaire de la souche HeLa avec les petites doses d'hormone, se manifeste également, aux fortes concentrations, dans la genèse des processus qui conduisent à la commune inhibition de la densité cellulaire par les trois hormones.

Pour l'œstradiol et la progestérone, en effet, comme le montre la figure 9, les valeurs des index cinétiques suivent régulièrement la courbe de croissance, l'inhibition de cet index étant proportionnellement plus importante en fonction des doses que la chute de la densité cellulaire qui l'accompagne. Cette correspondance paraît d'ailleurs parfaitement logique et l'on conçoit que l'altération du métabolisme cellulaire se traduise notamment par une altération de la synthèse des acides nucléiques qui prive ainsi la cellule de la possibilité d'entrer en mitose. La chute de l'index cinétique en fonction de l'augmentation des doses hormonales est un phénomène fréquent, signalé notamment par KAISER et MOHR (1961) qui utilisent cette inhibition de l'index mitotique pour étudier l'action de l'éthyniltestostérone sur

la croissance du carcinome utérin humain et du sarcome de Yoshida. Tondury avait d'ailleurs constaté, dès 1940, la présence d'hémiblastula bloquées par le stilbœstrol, et Agrell (1954) met en évidence, pendant les premiers stades de la segmentation de l'œuf d'oursin, l'inhibition mitotique de l'œstradiol et de la testostérone. Cagianut (1956) montre également des troubles de la mitose provoqués par les stéroïdes insaturés, suivis d'arrangement des chromosomes sans retard du rythme de la mitose. Lettre et Flandre (1961) ont enfin insisté sur la nette perturbation du déroulement de la division cellulaire sous l'action des dérivés du cholestérol.

Les hormones génitales font en effet partie de ce groupe de substances chimiques capables de produire des anomalies chromosomiques et de se comporter comme des poisons mutagènes et radiomimétiques. Elles vérifient en cela la règle qui réunit ces substances, à savoir qu'elles peuvent être cancérigènes ou inhibitrices sur la croissance des néoplasies en même temps qu'elles altèrent la mitose (Firket, 1951). Lorsque l'on étudie les variations de l'index mitotique des souches HeLa et K.B. sous l'action de la testostérone, on est en effet frappé de constater qu'il se produit, parallèlement à l'abaissement de la densité cellulaire, un maintien de l'index cinétique pour la souche HeLa et même une augmentation nette de cet index pour la souche K.B. Il semble alors que l'on puisse parler de blocage mitotique. Dans ce cas, le métabolisme cellulaire, bien que perturbé, a pu élaborer des acides nucléiques et permettre à la cellule d'entrer en mitose, mais cette cellule altérée ne peut mener à bien la division cellulaire et le noyau se bloque à un stade plus ou moins avancé pour dégénérer ensuite. Cet effet de la testostérone est d'ailleurs fréquent et paraît lui être relativement spécifique. Fleischman (1957) l'a notamment observé dans les vésicules de Souris mâles castrées

et soumises à l'action du cyclopropionate de testostérone. Le stillbœstrol, qui a permis à Algard (1960) d'induire, chez le Hamster, des tumeurs rénales expérimentales, augmente fortement l'index mitotique d'explants de cette tumeur. Debrunner (1953 1) a étudié statistiquement l'effet de la méthyltestostérone, de l'œstradiol et du stilbœstrol sur les fibrocytes de Lapin *in vitro*. Il a remarqué qu'à des doses de 0 à 20 µg/ml dans le milieu, agissant pendant neuf heures, les altérations morphologiques de la plaque équatoriale sont élevées, plus particulièrement avec le stilbœstrol où elles sont deux et trois fois plus importantes qu'avec la méthyltestostérone et l'œstradiol. Debrunner (1953 2) reprend ses expériences en ajoutant de l'A.R.N. aux cultures, mais ne modifie en rien l'action inhibitrice des hormones. Fujimori et ses collaborateurs (1957) ont étudié spécialement le métabolisme de l'acide nucléique du carcinome mammaire humain sous l'influence des hormones sexuelles. L'œstrogène paraît diminuer la synthèse des acides nucléiques en abaissant l'incorporation par les tissus cancéreux du phosphate marqué. Cagianut, Ruch et Staubli (1959) étudient, sous l'action des hormones sexuelles, les chromosomes métaphasiques des fibroblastes et montrent l'importance de la déviation chromosomique et de la perte en A.D.N. sous l'action de l'œstradiol et de la méthyltestostérone. Il ne faut pas oublier enfin que les hormones génitales sont capables de potentialiser l'action antimitotique de la colchicine sur des cultures de fibroblastes (Lettre. 1953). Nous avons étudié récemment l'action du diéthylstilbœstrol sur la souche K.B. (1962) et mis en évidence un blocage mitotique très élevé pour les doses voisines de 20 µg/ml. Cet œstrogène de synthèse, qui présente en outre sur la densité cellulaire une action superposable à celle des trois hormones que nous avons étudiées ici, met en valeur l'importance de ce blocage mitotique qui n'était qu'ébauché avec la testostérone sur cette même souche.

Il est donc possible de considérer cette élévation de l'index mitotique dans les deux souches sous l'action des doses élevées de testostérone comme un effet spécifique de l'hormone mâle, qui non seulement établit sur ce plan une différence d'action avec l'œstrogène, mais encore manifeste cette propriété particulière au niveau de la cellule cancéreuse banale que représente la souche K.B., mettant en valeur, pour un même effet global des hormones génitales, les voies différentes qu'elles peuvent suivre dans l'altération du métabolisme de la cellule néoplasique.

Ce polymorphisme de l'activité des hormones génitales dans leur aptitude à inhiber, par des voies diverses, le développement des cellules carcinomateuses isolées laisse espérer une voie d'abord utile sur la cellule tumorale lorsque l'on aura percé le secret de sa liaison avec le stroma qui en fait, pour l'heure présente, une unité physiologique tumorale dont nous ne savons pas contrôler les réactivités.

# Conclusions générales

I. — Nous avons en premier lieu montré, dans ce travail, que les propriétés générales et la stabilité relative des souches cellulaires tumorales HeLa et K.B. permettent de les considérer comme un matériel cellulaire approprié à l'étude de l'action des hormones génitales sur la cellule cancéreuse.

II. — Les doses d'hormones génitales que nous avons réalisées dans le milieu de culture de ces cellules s'échelonnent de 0,2 à 50 µg/ml. Elles sont supérieures aux doses physiologiques, mais inférieures aux concentrations qui provoquent encore, *in vitro*, une action hormonale classique.

III. — L'étude de l'action des hormones génitales sur la croissance nous permet, dans ces conditions, de mettre en évidence les faits suivants :

— Il existe une différence de réceptivité hormonale marquée entre la cellule carcinomateuse isolée et la cellule du tissu cancéreux. Plus précisément, des doses qui stimulent très fortement la croissance du tissu cancéreux, inhibent totalement la prolifération des souches HeLa et K.B.

— Il apparaît une action directe, indiscutable, des hormones sexuelles sur la croissance *in vitro* de la cellule cancéreuse. Cette action n'apparaît qu'à la dose de 20 µg/ml, elle est totalement inhibitrice pour la dose de 50 µg/ml, elle est enfin indépendante de l'hormone et de la souche considérée. Il s'agit donc d'une action toxique non spécifique.

— Au-dessous de cette dose toxique, les hormones sont totalement inactives sur la croissance de la cellule cancéreuse banale que représente la cellule K.B.

— Il existe par contre une très nette différence de réceptivité hormonale entre cellules HeLa et K.B.

*a)* Cette différence de réceptivité confirme l'activité directe des hormones à l'échelle cellulaire.

*b)* Elle démontre surtout la sensibilité spécifique aux hormones sexuelles de la cellule HeLa dont l'origine génitale permet de penser que la cellule carcinomateuse conserve les propriétés fondamentales de la cellule normale dont elle est issue.

*c)* Cette différence de réceptivité est variable avec l'hormone : faible pour la progestérone, elle est totale pour l'œstradiol et la testostérone.

*d)* Enfin cette réceptivité de la cellule HeLa se fait toujours dans le sens inhibiteur, ce qui est paradoxal dans le cas de l'œstradiol, et qui paraît prouver que la sensibilité particulière de la souche HeLa aux hormones génitales se traduit, entre nos doses, par une toxicité constante et croissante de ces hormones. L'antogonisme classique des hormones sexuelles est en effet démontré sur cette souche, par plusieurs auteurs, pour des concentrations inférieures à celles que nous avons adoptées.

— L'action toxique brutale et non spécifique exercée par les trois hormones génitales pour nos fortes do-

ses, et qui se révèle identique pour les deux souches cellulaires, utilise en réalité des mécanismes différents suivant l'hormone en cause. L'élévation de l'index cinétique, parallèlement à l'inhibition de la croissance cellulaire, dans le cas de la testostérone, permet en effet d'attribuer à cette hormone le rôle d'un bloqueur mitotique vis-à-vis des deux souches HeLa et K.B.

*Le Président de Thèse :*

BIMES

*Vu, le Doyen :*

LAZORTHES.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Toulouse, le 18 juin 1962.

*Le Recteur,*

*Président du Conseil de l'Université,*

DOTTIN.

# OUVRAGES GÉNÉRAUX CONSULTÉS


CAMERON Gladys. — Tissue Culture Technique. — *Academic Press Inc.*, New York, 1950.

CHÈVREMONT M. — Notions de Cytologie et Histologie. — Ed. Deboer, Liége, 1956.

CRACIUN *E.* C. — La culture des tissus en biologie expérimentale. — Masson, édit., Paris, 1931.

EPHRUSSI B. — La culture des tissus. — Gauthier-Villars, édit., Paris, 1932.

GAILLARD P. J. — Hormones regulating growth and differenciation in Embryonic explants. — Herman, édit., Paris, 1942.

PARKER R. C. — Methods of tissue culture. — Paul B. Hoeber Inc., 2e éd., 1950.

PAUL J. — Cell and tissue culture. — E. and S. Livingstone L.T.D., Edinburgh and London, 2e éd., 1960.

SMITH G. V. — Texbook of Endocrinology. — Williams and Co, edit., Philadelphia and London, 1955.

# BIBLIOGRAPHIE


AGRELL I. — Oestradiol and testosterone propionate as mitotic inhibitors during embryogenesis. — *Nature,* 1954, 173, 172.

AHLSTROM C. G., JONSSON N. — Effect of sex hormones on Ehrlich mouse ascites cancer. — *Acta Endocr.,* 1960, 34, 437.

AHLSTROM C. G., STORMBY N. — Hormonal influence on the growth of heterologously transplanted Ehrlich mouse ascites cancer. I. Influence of sex on the growth of the cancer in hamster. II. Effet of castration on the growth of the cancer in hamster. III. Effect of testosterone on the growth of cancer in hamster. *Acta Path. microb. Scand.,* 1958, 43, 21-27-34.

AHREN K., ETIENNE M. — Stimulation of mammary glands in hypophysectomized male rats treated with ovarian hormones and insulin. — *Acta Endocr.,* 1958, 28, 89.

AHREN K., ETIENNE M. — The effect of testosterone alone and combined with insulin on the mammary glands of castrated and hypophysectomized rats. — *Acta Endocr.,* 1959, 30, 109.

ALGARD F. Th. — Hormone - induced tumors. I. Hamster flank-organ and kidney tumors in vitro. — *Journ. Nat. Cancer Inst.,* 1960, 25, 557.

ANGELA G. C., GALLI DELLA LOGGIA D., GRILLONE W. — Citomorfologia di un epitelioma (KB) coltivato in vitro. — *Ann. Laring.,* 1958, 57, 571.

AUERBACH R. — Morphogenetic interactions in the development of the mouse thymus gland. — *Dev. Biol.,* 1960, 2, 271.

BAGGET B., ENGEL L. L., SAVARD K., DORFMAN R. L. — The conversion of testosterone 3-C$^{14}$ in C$^{14}$ oestradiol. 17$\beta$ by human ovarian tissue. — *Journ. Biol. Chem.,* 1956, 221, 931.

BARBER M., DELAUNAY A. — Effet du plasma prélevé chez des cobayes traités par la cortisone sur des cultures in vitro de fibroblastes et de macrophages. — *Ann. Inst. Pasteur,* 1951, 81, 193.

BARBIERI G., OLIVI M., SACRO O. — Lesioni microscophiche nell' utero di topi (BALB/ cf. $C_3H$/ Cb/Sc substrain) trattati con benzoato di estradiolo. — *Lav. Ist. Anat. Unic.,* 1958, 18, 165.

BENGMARK S., INGEMANSON B., KALLEN B. — Endocrine dependance of rat prostatic tissue in vitro. — *Acta Endocr.*, 1959, 30, 459.

BIGGERS J. D., CLARINGBOLD P. J., HARDY M. M. — The action of oestrogens on the vagina of the mouse in tissue culture. — *Journ. Physiol.*, 1956, 131, 497.

BIMES C., PLANEL H., DAVID J. F. — Recherches histochimiques sur la souche cancéreuse HeLa. — *C. R. Soc. Biol.*, 1959, 153, 347.

BIMES C., PLANEL H., DAVID J. F. — Action des œstrogènes sur la souche cellulaire cancéreuse HeLa. — *C. R. Soc. Biol.*, 1959, 153, 1072.

BIMES C., PLANEL H., DAVID J. F. — Culture d'épithélium vaginal in vitro. — *C. R. Assoc. Anat.*, 1960, 106, 106.

BIMES C., PLANEL H., DAVID J. F. — Action des hormones génitales sur la souche tumorale HeLa et sur diverses catégories cellulaires normales cultivées in vitro. — *C. R. Soc. Biol.*, 1961, 155, 138.

BIMES C., PLANEL H., DAVID J. F. — Etude comparée de l'œstradiol et de la testostérone sur la souche cancéreuse HeLa, sur les fibroblastes et l'épithélium utérin in vitro. — *Pathol. Biol.*, 1961, 9, 604.

BIMES C., PLANEL H., DAVID J. F., SOLEILHAVOUP J. P. — Action comparée de l'œstradiol et de la progestérone sur les souches cellulaires tumorales HeLa et K.B. — *XLVII*e *Réunion des Anatomistes*, Naples, mars 1961, 26.

BOYER G. S., LEUCHTENBERGER C., GINSBERG H. S. — Cytological and cytochemical studies of HeLa cells infected with adenoviruses. *Journ. Exper. Med.*, 1957, 105, 195.

BREUER H. — Wirkung von Steroidhormonen auf den Stoffwechsel menschlicher Prostata-adenome. — *Acta Endocr.*, 1957, 26, 322.

BRINCK-JOHNSEN T., EIK-NES K. — Effect of human chorionic gonadotropin on the secretion of testosterone and 4-androstene-3,17 Dione by the canine testis. — *Endocrinology*, 1957, 61, 676.

BROWN J. B. — The metabolism of oestrogens and the measurement of the excretory products in the urine. — *Journ. Obst. Gyn. Brit. Emp.*, 1959, 66, 804.

BROWNING H. C., WHITE W. D., SADLER W. A. — Inhibition of growth of a transplanted adrenal cortical tumor by sex steroids. — *Cancer Research*, 1959, 19, 819.

BULLOUGH W. — A study of the hormonal relations of epidermal mitotic activity in vitro. — *Experim. Cell Research*, 1954, 7, 176.

BUNO W., GOYENA H. — Effect of cortisone upon growth in vitro of femur of the chick embryo. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1955, 89, 622.

GAGIANUT B. — Steroid und Wachsteim. — *Schweiz. Med. Wschr.*, $1956_1$, 86, 12.

GAGIANUT B., RUCH F., STAUBLI N. — Über das Verhalten der Desoxyribonukleinsäure (D.R.N.) während der Mitose unter Einwirkung von Oestradiol und Methyltestosterone. Untersuchungen an Metaphasechromosomen von Fibrozytengewebekulturen. — *Z. Zellforsch*, 1959, 50, 28.

CHANG S. R. — Genetic study of human cells in vitro. Carbohydrate variants from cultures of HeLa and conjunctival cells. — *Journ. Exper. Med.*, 1960, III, 235.

CHU E. H. Y., GILES N. H. G. — Comparative chromosomal studies on mammalian cells in culture. I. The HeLa strain and its mutant clonal derivatives. — *Journ. Cancer Inst.*, 1958, 20, 383.

CIECIURA S. J., MARCUS P. I., PUCK T. T. — The use of X-irradiated HeLa cell giants to detect latent virus in mammalian cells. — *Virology*, 1957, 3, 426.

COLONNA M. — Ricerche sperimentali sulla genesi dei tumori cistici ovarici nel ratto. — *Gazz. mt. Med. Chir.*, 1958, 63, 1363.

CORNMAN I. — Lésion sélective des fibroblastes par la désoycorticostérone dans des cultures mixtes de tissus. — *Science*, 1951, 113, 37.

COUJARD R. — Le rôle du sympathique dans les actions hormonales. *Bull. Biol.*, 1943, 77, 120.

DALTON A. J., EAGLE H., FELIX M. D. — Phase-contrast and electron microscopy of HeLa cells grown in a tyrosine-free medium. — *Journ. Histochem. Cytochem.*, 1956, 4, 433.

DAMBY M. — *Endocrinology*, 1940, 27, 236.

DAVID J. F. — La souche cancéreuse HeLa. Etude générale et recherches histochimiques. — Thèse Doct. Méd., 1958, 82.

DEBRUNNER H. U. — Influence des hormones sexuelles sur la mitose. *Schweiz. Z. Allg. Path. Bak.*, 1953, 16, 695.

— Effets de l'acide ribonucléique sur l'inhibition hormonale de la mitose. — *Schweiz. Z. Allg. Path. Bakt.*, 1953, 16, 701.

DEFENDI V., BILLINGHAM R. E., SILVERS W. K., MOORHEAD P. — Immunological and Karyological Criteria for Identification of Cell lines. — *Journ. Nat. Canc. Inst.*, 1960, 25, 359.

DIRSCHERL W., KRUSKEMPER H. L. — Über die Spaltung von Steroidhormonestern durck tierische Gewelse. 38. Sexualhormone, Steroides und Sterine. — *Biochem. Z.*, 1953, 323, 520.

DONTENWILL W., EDER M. — Histogenese und biologische Verhaltenweise hormonell ansgelöster Geschwülste. — *Bertr. path. Anat.*, 1959, 120, 270.

DONTENWILL W., WRBA H. — Das Wachstum des durch Oestrogene erzerigten Nierentumors beim Goldhamster in der Guvebskultur. *Beitz. pathol. Anat.*, $1959_1$, 121, 301.

DONTENWILL W., WRBA H. — Die spezifische Wirkung von Oestronsulfat auf Gewebekulturen eins Hormonin duzierten Nierentumors beim Golbhamster. — *Klin. Wschr.*, 1959 $_2$, 97, 772.

DUX C. — Sur les cultures de l'épithélium vaginal in vitro et sur leur sensibilité aux hormones ovariennes. — *Ann. Endocrin.*, 1941, 2, 39.

DWITT S. H., ROBSON A. S., LEGALLAIS F. Y., VECCHIO P. R., MELMGREN. — Chromocenter resembling sex chromatin in human tissue culture cell lines. — *Journ. Nat. Cancer Inst.*, 1959, 23, 1089.

EAGLE H. — Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma strain K.B. — *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, 1955 $_1$, 89, 362.

— Nutritional needs of mammalian cells in tissue culture. — *Science*, 1955 $_2$, 122, 501.

— Utilization of dipeptides by mammalian cells in tissue culture. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, 1955 $_3$, 89, 96.

— The specific amino acide requirements of a human carcinoma cell (strain HeLa) in tissue culture. — *Journ. exper. Med.*, 1955 $_4$, 102, 37.

— The minimum vitamin requirements of the L and HeLa cells in tissue culture, the production of specific vitamin deficiencies, and their cure. — *Journ. exper. Med.*, 1955 $_5$, 102, 595.

— Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. — *Science*, 1959, 130, 432.

EAGLE H., OYAMA V. I., LEVY M. — Amino acid requirements of normal and malignant human cells in tissue culture. — *Arch. Bioch. and Biophysics*, 1955, 67, 432.

EAGLE H. — Relative growth-promoting activity in tissue culture of co-factors and the parent vitamins. — *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, 1956 $_1$, 91, 358.

— The salt requirements of mammalian cells in tissue culture. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1956 $_2$, 61, 356.

EAGLE H., OYAMA V. I., LEVY M., FREEMAN A. E. — Myo-inositol as an essential growth factor for normal and malignant human cells in tissue culture. — *Biol. Chem.*, 1957, 226, 191.

EAGLE H., OYAMA V. I., LEVY M., HORTON C. L., FLEISCHMAN R. — The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. — *Journ. Biol. Chem.*, 1956, 218, 607.

EAGLE H., PIEZ K. A., FLEISCHMAN R. — The utilization of phenylalanine and tyrosine for protein synthesis by human cells in tissue culture. — *Journ. Biological Chemistry*, 1957, 228, 847.

EAGLE H., OYAMA V. I., LEVY M., FREEMAN A. — Myo-inositol as an essential growth factor for normal and malignant human cells in tissue culture. — *Science,* 1956, 123, 845.

ELIAS J. J. — Cultivation of adulte mouse mammary gland in hormone-enriched synthetic medium. — *Science,* 1957, 126, 842.

— Effect of insulin and cortisol on organ cultures of adulte mouse mammary gland. — *Proc. Soc. exper. Biol. Med.,* 1959, 101, 500.

ELIAS J. J., RIVIERA E. — Comparison of the responses of Normal, precancerous and neoplastic mouse mammary tissues to hormones in vitro. — *Cancer Research,* 1959, 19, 505.

EMMENS C. W., LUDFORD R. J. — Action of oestrogens on the female genital tract. — *Nature.* 1940, 145, 746.

ENGEL L. L. — The biosynthesis of oestrogens. — *Cancer,* 1957, 10, 711.

EVANS V. J., BRYANT J. C., MACQUILKIN W. T., FIORAMONTI M. C., SANFORD K. K., WESTFALL B. B., EARLE W. R. — Studies of nutrient media for tissue cells in vitro. II. An improved proteinfree chemically defined medium for long term cultivation of strain L 929 cells. — *Cancer Research,* $1956_1$, 16, 87.

EVANS V. J., BRYANT J. C., FIORAMONTI M. C., MACQUILKIN W. T., SANFORD K. K., WESTFALL B. B., EARLE W. R. — Studies of nutrient media for tissue cells in vitro. I. A protein free chemically defined medium for cultivation of strain L cells. — *Cancer Research,* $1956_2$, 16, 77.

FELDMAN J. D. — Steroid effects on human leucocytes. — *Endocr.,* 1952, 51, 258.

FELL H. B. — The effect of hormones and vitamin A on organ cultures. — *Ann. Acad. Scien.,* 1954, 58, 1183.

FELL H. B., MELLANBY E. — The biological action of tyroxine on embryonic bones grown in tissue culture. — *Journ. Physiol.,* 1955, 127, 427.

FELS E. — Rückbildung der experimentellen Ovarial tumoren unter dem Einfluss Ostrogener oder androgener Hormone. — *Acta endocr.,* 1958, 28, 349.

FIRKET H. — A propos des poisons mitotiques. — *Brux. Méd.,* 1951, 28, 1426.

FISCHER A., DAVIDSOHN F. — Present condition of a twelwe-year old pure strain of carcinoma cells in vitro. — *Nature,* 1939, 143, 436.

FISCHER H. W., PUCK T. T. — On the functions of X-irradiated « feeder » cells in supporting growth of single mammalian cells. *Proc. Nation. Acad. Sci.,* 1956, 42, 900.

FISCHER H. W., PUCK T. T., SATO G. — Molecular growth requirements of single mammalian cells : the action of fetuin in pro-

moting cell attachement to glass. — *Proc. Nation. Acad. Sci.*, 1958, 44, 4.

FISCHER H. W., PUCK T. T., SATO G. — Molecular growth requirements of single mammarian cells. III. Quantitative colonial growth of single S 3 cells in a medium containing synthetic small molecular constituents and two purified protein fractions. *Journ. exper. Med.*, 1959, 109, 649.

FISHMAN W. H. — Relationship between oestrogens and enzymic activity. — *Vit. and Horm.*, 1951, 9, 213.

FLEISCHMANN W. — Effects of androgens on the cytology of X-irradiated seminal vesicles. — *Exper. Cell Res.*, 1957, 13, 604.

FORBES T. R., HOOKER C. W. — Plasma levels of progestin during pregnancy in the mouse. — *Endocrinology*, 1957, 61, 281.

FRANK J. A., DOUGHERTY T. F. — Cytoplasmic budding of human lymphocytes produced by cortisone and hypdrocortisone in in-vitro preparations. — *Proc. Soc. exper. Biol.*, 1953, 82, 17.

FRANKLIN A. E. — The effect of hormones in HeLa cells inoculated with infections hepatitis specimens. — *Canadian Journ. Microbiology*, 1960, 6, 529.

FRANKLIN A. E., SINCLAIR J. C. — Tissue culture studies with infectious hepatitis specimens. — *Cancer Journ. Microbiol.*, 1959, 5, 567.

FRANKS L. M. — The effects of age on the structure and response to oestrogens and testosterone of the mouse prostate in organ cultures. — *Brit. Journ. Cancer*, 1959, 13, 59.

FRANKS L. M., CHESTERMAN F. C. — Adrenal degeneration and tumour formation in the golden hamster following treatment with stillboestrol and methyl-cholanthrene. — *But. Journ. Cancer*, 1957, 11, 105.

FUJIMORI M., YASABE H., ISHIZUNKA M., MIURA Y. — Studies on the nucleic acid metabolism of human mammary carcinoma, with special reference in the effect of sex hormone. — *Gann.*, 1957, 48, 189.

GAILLARD P. J. — Methods in medical Research. — *Book Publi.*, 1951, 4, 241.

— Parathyroid gland tissue and bone in vitro. II. III. — *Proc. Ser.*, $1955_1$, 58, 286.

— Parathyroid gland tissue and bone in vitro. — *Exptl. Cell Res. Suppl.*, $1955_2$, 3, 154.

— Parathyroid gland and bone in vitro. — *Schweiz. Med. Wschr.*, $1957_1$, 87, 447.

— Anterior hypophysis and cortex surrenal in vitro. — *Versl. Kon. Acad.*, $1957_2$, 66, 60.

— Parathyroid gland and bone in vitro. — *Developt. Biol.*, 1959, 1, 152.

GARCIA H., VERGARA J., GASIC G. — Acción de la cortisona sobre dos tumores transplantables del ratón. — *Biologica*, 1958, 26, 47.

GARDNER W. V. — Steroids in experimental carcinogenesis. — *Cancer* 1957, 10, 726.

— Experimental induction of uterine cervical and vaginal cancer in mice. — *Cancer Research*, $1959_1$, 19, 170.

— Carcinoma of the uterine cervix and upper vagina : induction under experimental conditions in mice. — *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, $1959_2$, 95, 543.

GARDNER W. V., PFEIFFER C. A., TRENTIN J. J., WOLSTENHOLME J. T. Hormonal factors in experimental carcinogenesis. — *In :* HAMBURGER F., FICHMAN W. F., The physiopathology of Cancer. 1954, Hoeber and Harper, New York.

GERGER R. S., DINGWALL S. A., ANDRUS W. — The effect of cortisone on the growth of adult and embryonic tissue in vitro. — *Amer. Journ. Med. Sci.*, 1956, 231, 427.

GEY G. O., BANG F. B., GEY M. K. — Responsès of a variety of normal and malignant cells to continuous cultivation, and some practical applications of these responses to problems in the biology of disease. — *Ann. Acad. Sc.*, 1954, 58, 976.

GEY G. O., BANG F. B., GEY M. K. — An evaluation of some comparative studies on cultured strains of normal and malignant cells from animal and man. — *Biol. Med.*, 1955, 12, 805.

GEY G. O., COFFMAN W. D., KUBICEK M. T. — Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. — *Cancer Research*, 1952, 12, 264.

GISCHICKTER C. F., HARTMAN C. G. — Mammary response to prolonged oestrogene stimulation in the monkey. — *Cancer*, 1959, 12, 767.

GLENN M. E., RICHARDSON S. L., LYSTER S. C., BOWMAN B. J. — Inhibition of mammary fibroadenoma of female rats by steroids of the androstane series. — *Endocrinology*, 1959, 64, 390.

GOLDBERG M. F., FREGIER A., GROSSMAN M. S. — Mechanism of tumor inhibition by oestrogen. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1959, 102, 408.

GOLDIE H., WALKER M., CHAMBERS K., ROBERTS V. — Growth and implantation of free tumor cells in ascites tumors of mice previously given sex hormones. — *Cancer Research*, 1959, 19, 28.

GOLDSTEIN L., CAILLEAU R., CROCKER T. T. — Nuclear-cytoplasmic relationship in human cells in tissue culture. II. The microscopic behaviour of enucleate human cell fragments. — *Exper. Cell Res.*, 1960, 19, 332.

GOLDSTEIN M. N., GALLAGHER J. — Desoxyribonucleic acid content of HeLa stock and newly established clone cultures. — *Journ. Nat. Canc. Inst.*, 1959, 22, 953.

GORANSON E. S., CINITS E., HERCZ A. — The effect of glucagon on tumor growth. — *Cancer Research*, 1959, 19, 512.

GOYENA H. — *Acta Physiol.*, 1955, 5, 215.

GREEN M. H., VERNEY E. L. — A simple method for the study of intracellular acid phosphatase in HeLa cells. — *Journ. Histochem. Cytochem.*, 1956, 4, 106.

GROPP A., HUKE K. — Phasinkonstrast-mikroskopische beobactungen bei der phagocytose an normalin fibroblasten, an zellen eines maüsesarkoms sowie an HeLa-zellen. — *Zeit. für Kresbsf.*, 1956, 61, 263.

GROSSFIELD H. — Action of hydrocortisone on respiration of human cancer cells in tissue culture. — *Nature*, 1958, 182, 35.

— Action of hydrocortisone on respiration and aerobie glycolysis of cultured cells. — *Science*, 1958, 127, 148.

— Action of adrenal cortical steroids on cultured cells. — *Endocr.*, 1959, 65, 777.

GROSSFIELD H., RAGAN C. — Action of hydrocortisone on cells in tissue culture. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1954, 86, 63.

GROSSFIELD H., RAGAN C. — Action of hydrocortisone on respiration and aerobic glycolysis of cultured cells. — *Science*, 1958, 127, 148.

HANKS J. H., WALLACE R. E. — Relations entre l'oxygène et la température dans la conservation des tissus par réfrigération. — *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, 71, 196.

HARDY M. H., BIGGERS J. D., CLARINGBOLD P. J. — Vaginal cornification of the mouse produced by oestrogens in vitro. — *Nature*, 1953, 172, 1196.

HERNING E. S. — Carcinogenic action of androgens. — *Cancer*, 1958, 12, 414.

HERVÉ R., SERGENT F. — *Gynécologie et Obstétrique*, 1961, 60, 55.

HOLLANDER N., HOLLANDER V. P. — The effect of follicule-stimulating hormone on the biosynthesis in vitro of oestradiol 17 $\beta$ from acetate-I-C 14 and testosterone-4-C 14. — *Journ. Biol. Chem.*, 1958, 233, 1097.

HSU T. C. — Cytological studies on HeLa, a strain of human cervical carcinoma. I. Observations on mitosis and chromosomes. *Rep. Biol. Med.*, 1954, 12, 833.

— Mammalian chromosomes in vitro. Observations on mitosis with phase cinematographie. — *Journ. Nation. Cancer. Inst.*, 1955, 16, 691.

— Generation tissue of HeLa cells determined from cine records. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 1960, 18, 31.

HSU T. C., MOORHEAD P. S. — Chromosome anomalies in human neoplasms with special reference to the mechanism of polyploidization and aneuploidization in the HeLa strain. — *Ann. Acad. Sc.*, 1956, 63, 1083.

HSU T. C., MOORHEAD P. S. — Mammalian chromosomes in vitro. VII. Heteroploidy in human cell strains. — *Journ. Nat. Cancer Inst.*, 1957, 10, 463.

HUGGINS C., BRIZAERELLI G., SUTTON. — Rapid induction of mammary carcinoma in the rat and the influence of hormones on the tumors. — *Journ. Exp. Med.*, 1959, 109, 25.

IGLESIAS R., MARDONES E. — Influence of hormones on the growth of a transplantable suprarenal tumour. — *Brit. Journ. Cancer*, 1958, 12, 28.

IMAI H. — An adrenocortical response of mouse lymph node to oestrogen treatment. — *Acta anat. Nippon*, 1957, 32, 571.

IVERSEN S. — A target-theory interpretation of the dose-response relation-ship between oestrogen and functional differenciation of the mammary gland in spayed mice. — *Journ. Endocr.*, 1958, 17, 99.

JABARA A. G. — Canine ovarian tumors following stilbœstrol administration. — *Aust. Journ. Biol. Med. Sci.*, 1959, 37, 549.

JACOBS B. B., HUSEBY R. A. — Hormonal influence on the growth of a transplantable mammary adenocarcinoma in C 3 H mice. *Journ. Nat. Cancer Inst.*, 1959, 23, 1107.

JACQUEZ J. A., BARRY E. — Tissue culture media. The essential non-dialyzable factors in human placental cord serum. — *Journ. Gen. Physiol.*, 1951, 34, 765.

JAMBON M., FLANDRE O. — Action de la « triamcinolone » sur les fibroblastes en culture in vitro. — *Rev. franç. Anat. clin. et biol.*, 1959, 10, 1048.

JEDEKIN L. A., WHITE A. — In vitro and in vivo effects of steroids on glucose oxydation and respiration by normal and malignant lymphoid tissue. — *Endocrinol.*, 1958, 63, 226.

KAHN R. H. — Effect of locally applied vit. A and oestrogen on the rat vagina. — *Amer. Journ. Anat.*, $1954_1$, 95, 309.

— Effect of oestrogen and of vitamin A on vaginal cornification in tissue culture. — *Nature*, $1954_2$, 174, 317.

KAISER R., MOHR U. — Zur Frage der Wirkung von Ethinylnortestosteronacetat auf das Wachtum bistimmter Sarkome. — *Z. Krebs.*, 1961, 64, 122.

KALLEN B., ROHL L. — Tissue Culture studies of endocrine dependency of human prostatic hyperplasia. — *Urol. Int.*, 1960, 10, 329.

KATSUTA H., TAKAOKA T., FURUKAWA T., KAWANA M. — Cultivation of strain HeLa cells (cervical carcinoma of human uterus) in a protein-free medium. — *Jap. Journ. Exp. Med.,* 1960, 30, 147.

KATSUTA H., TAKAOKA T., KIKUCHI K. — Further studies of amino-acid requirements of a sub-line of strain L cells (mouse fibroblasts) in synthetic media. — *Jap. Journ. Exp. Med.,* 1961, 31, 125.

KAWADA I. — Effects of progesterone and oestrogens on the multiplication of chick embryo-fibroblasts, rat acites hepatoma cells, and strain HeLa cells (cervical carcinoma of human uterus) in tissue culture. — *Jap. Journ. Exp. Med.,* 1959, 29, 615.

KELLAR R., MATTHEW G. D., MCKAY R., ROY E. J., BROWN J. B. — Some clinical applications of oestrogen essay. — *Journ. Obst. and Gynecol. Brit. Emp.,* 1959, 66, 815.

KIRKMAN H. — Steroid tumorigenis. — *Cancer,* 1957, 10, 757.

KITS, BARROW E. S. — The effects of adrenal cortical hormone on the incorporation of 14 C into the proteins of lymphatic cells. — *Endocrinol.,* 1953, 19, 51.

KLINE I., LEIGHTON J., BELKIN M., ORR H. C. — Some observations on the response of four established human cell strains to hydrocortisone in tissue culture. — *Cancer Research,* 1957, 17, 780.

KNOX W. E., AUERBACH V. H. — The hormonal controle of tryptophan peroxydase in the rat. — *Journ. Biol. Chem.,* 1955, 214, 307.

KONOPLEV V. P. — Hepatomas in male rats induced with synoestrol (hexoestrol) and testosterone propionate. (Texte en russe.). — *Vopr. Onkol.,* 1959, 5, 138.

KOWALEWSKI K., MCEACHERN. — Effect of cortisone on growth and on 35 S uptake by mucopolysaccharride of transplanted osteosarcoma in rats. — *Acta Endocr.,* 1959, 32, 19.

KRZYMIEŃ H. — Wphjw. Kortyzonu na fagocytoze i hemolize « in vitro ». — *Pol. Tyz. Lek.,* 1956, 11, 1981.

KUBESAR-GERGELY J., FEKETE I. — Einfluss des Progesterons auf die Tumorentwicklung bei Tieren mit verschiedenen Hormonniveaus. — *Naturwissenschaften,* 1960, 47, 113.

KULLANDER S., KALLEN B. — Studies on the growth of experimental ovarian tumors in tissue culture. — *Acta Endocrinol.,* 1959, 32, 41.

LACASSAGNE A. — Apparition de cancers de la mamelle chez la souris mâle soumise à des injections de folliculine. — *C. R. Acad. Sc.,* 1932, 195, 630.

LAGOVA N. D. — Thérapeutique hormonale du carcinome des glandes mammaires chez les rats. (Texte russe.) — *Prohl. Endokr.,* 1960, 6, 3.

LASFARGUES E. Y. — Cultivation and behaviour in vitro of the mammary epithelium of the adult mouse. II. Observations on the secretory activity. — *Exp. Cell Res.*, 1957, 13, 553.

LASFARGUES E. Y., MURRAY M. — Hormonal influences on the differenciation and growth of embryonic mouse mammary glands in organ culture. — *Development Biol.*, 1959, 1, 413.

LASFARGUES E. Y. — *XIth Annual Meeting of Tissue Culture Association, Excerpta medica*, 1960, 145, 347.

— Influences hormonales sur le développement structural et fonctionnel d'organes en culture. — *Path. Biol.*, 1961, 9, 633.

LASFARGUES E. Y., OZZELLO L. — Cultivation of human breast carcinomas. — *Journ. Nat. Cancer Inst.*, 1958, 21, 1131.

LASNITZKI I. — The effect of oestrone alone and combined with 20 methylcholanthrene on mouse prostate glands grown in vitro. *Cancer Research*, 1954, 14, 623.

— The effect of testosterone propionate on organ cultures of the mouse prostate. — *Journ. Endocrin.*, 1955, 12, 236.

— The effect of carcinogens, hormones and vitamins on organ cultures. — *Inter Review Cytol.*, 1958, 7, 80.

LEIGHTON J. — A sponge matrix method for tissue culture. Formation of organized aggregates of cells in vitro. — *Journ. Nation. Cancer Inst.*, 1952, 12, 545.

— Studies on human cancer using sponge matrix tissue culture. The growth patterns of a malignant melanoma, adenocarcinoma parotid gland, adenocarcinoma of the thyroid gland, adenocarcinoma of the pancreas, and epidermoid carcinoma of the utherine cervix (Gey's HeLa strain). — *Texas Rep. Biol. Med.*, 1954, 12, 847.

LEIGHTON J., KLINE I. — Studies of human cancer using sponge matrix tissue culture. II. Invasion of connective tissue by carcinoma (strain HeLa). — *Texas Rep. Biol. Med.*, 1954, 12, 865.

LEIGHTON J., KLINE I., BELKIN M., LEGALLAIS F., ORR H. C. — The similarity in histologic appearance of some human « cancer » and « normal » cell strains in sponge matrix culture. — *Cancer Research*, 1957, 17, 359.

LEIGHTON J., KLINE I., ORR H. C. — Transformation of normal human fibroblasts into histologically malignant tissue in vitro. *Science*, 1956, 17, 359.

LELLI G., BALDUCCI D., GORI G. B., BONDI M. — Contributo allo studio morfologico delle cellule coltivate in vitro. « Formula-cellulare » di cinque ceppi di cellule umane. — *R. C. Ist. Sup. Sanità*, 1957, 20, 1113.

LENTI G., TORTAROLO E., MUSOLINO G., TAPPARO D. — Azione dell' idrocortisone su elementi coltivati in vitro. — *Folia endocr.*, 1956, 9, 741.

LEONE V., HSU T. C., POMERAT C. M. — Cytological studies on HeLa, a strain of human cervical carcinoma. II. On rotatory movements of the nuclei. — *Z. Zellforsch. mikr. Anat.,* 1955, 41, 481.

LÉPINE P., SLIZEWICZ P., DANIEL Ph., PACCAUD M. — Cultures cellulaires dans un milieu utilisant l'hydrolysat de caséine comme source d'acides aminés. — *Ann. Inst. Pasteur,* 1956, 90, 654.

LESLIE I., SINCLAIR R. — The action of thyroxine and triiodothyronine on human cells growing in tissue culture. — *Exp. Cell Res.,* 1959, 17, 272.

LETTRE H., FLANDRE O. — Etude de l'action de quatre dérivés du cholestérol sur des cellules vivantes cultivées in vitro. — *Rev. franç. Etudes clin. et biol.,* 1959, 4, 335.

LEWIS W. H. — Pynocytosis. — *Johns Hopkins Hosp. Bull.,* 1931, 49, 17.

LOCKHART R. Z., EAGLE H. — Requirements for growth of single human cells. — *Science,* 1959, 129, 252.

LUCAS W. M., WHITMORE W. F., WEST C. D. — Identification of testosterone in human spermatic vein blood. — *Journ. Clin. Endocr. and Metabol.,* 1957, 17, 465.

MCGREGOR R. F., PUTCH J. D. — Oestrogen-induced kidney tumors in the golden hamster. I. Biochemical composition during tumorigenesis. — *Journ. Nat. Cancer Inst.,* 1960, 24, 1057.

MCQUILKIN W. T., EVANS W. S., EARLE W. R. — The adaptation of additional lines on NC TC Clone 929 (strain L) cells to chemically defined protein-free medium NCTC 109. — *Journ. Nat. Cancer Inst.,* 1957, 19, 885.

MARCUS P. I., CIECIURA S. S., PUCK T. T. — Clonal growth in vitro of epithelial cells from normal human tissues. — *Journ. Exper. Med.,* 1956, 104, 615.

MARTIN L. — Growth of the vaginal epithelium of the mouse in tissue culture. — *Journ. Endocr.,* 1959, 18, 334.

MASON N. R., SAMUELS L. T. — *Endocr.,* 1961, 68, 899.

MEISSNER W. A., SOMMERS S. C., SHERMAN G. — Endometrial hyperplasia, endometrial carcinoma, and endometriosis produced experimentally by oestrogen. — *Cancer,* 1957, 10, 500.

MELNICK J. L., RIORDAN J. T. — Poliomyelitis viruses in tissue culture. IV. Protein-free nutrient media in stationary and roller tube cultures. — *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.,* 1952, 81, 208.

MIKHAIL G., NOALL M. W., ALLEN W. M. — Progesterone levels in the rabbit ovarian vein blood throughout pregnancy. — *Endocrinology,* 1961, 69, 504.

MILES C. P. — Sex chromatin in cultured normal and cancerous human tissues. — 1959, 12, 299.

MONESI. — Influenza degli ormoni sessuali sulla crescita dell' adenocarcinoma mammario spontaneo del topo in vitro. — *Tumori,* 1956 $_1$, 42, 334.

— Influenza dell'ormone somatotrope sulla crescita dei fibroblasti di cuore di embrione di pollo « in vitro ». — *Tumori,* 1956 $_2$, 42, 591.

— Influenza del glucagone sulla crescita dei fibroblasti di cuore di embrione di pollo in vitro. — *Tumori,* 1956 $_3$, 42, 460.

MONESI V., RABOTTI G. C., VERONESI V. — Influenza ormoniche sulla crescita in vitro dell'adenocarcinoma mammario spontaneo del topo. I. Azione del testosterone, estrene e progesterone. — *Att. della Soc. Milanesi di Sc. Med. e Biol.,* 1956 $_4$, 11. 182.

MONTENEGRO-ORTIZ M., SILVA-INZUNZA E. — Clinical application of tumoral sexology. — *Journ. Amer. Med.,* 1958, 13, 303.

MOON H. D., JENTOFT V. L., LI C. H. — Effect of human growth hormone on growth of cells in tissue culture. — *Endocrinology,* 1962, 70, 31.

MOON H. D., VINCENT L. — Effect of somatotropin on cells in tissue culture. — *Science,* 1957, 125, 643.

MOORE J. G., BRANDKAMP W. W., BURNES W. L. — Evaluation of chemotherapy in ovarian and cervical cancer by tissue culture methode. — *Amer. Journ. Obst. and Gynec.,* 1959, 77, 780.

MOORE A. E.,SABACHEWSKY L., TOOLAN H. W. — Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. — *Cancer Research,* 1955, 15, 598.

MOORE A. E., SOUTHAN C. M., STERNBERG S. S. — Neoplastic changes developping in epithelial cell lines derived from normal persons. *Science,* 1956, 124, 127.

MOORHEAD P. S., HSU T. C. — Cytologic studies of HeLa, a strain of human cervical carcinoma. III. Durations and characteristics of the mitotic phases. — *Journ. Nation. Cancer Inst.,* 1956, 16, 1047.

NANCINI R. E., SACERDOTE DE LUSTIG Y. E. — Acción de la desoxicorticosterona y cortisona sobre las mucoproteinas de los fibroblastos « in vitro ». — *Rev. Soc. Argent. Biol.,* 1951, 27, 86.

NISHIMURA E. T., HARWOOD T. R., BAUM J. H., PUTONG P. B. — The influence of tissue extracts on the growth of Ehrlich tumors. — *Arch. Path.,* 1958, 65, 88.

OERTEL, WEISS, EIK-NES. — *Journ. Clin. Endocr.,* 1959, 19, 213.

ORSI E. V., RITTER H. B. — A report of sex chromatin in human tumor tissue culture. — *Exp. Cell Res.,* 1958, 15, 244.

OTANI H. — Effects of sex hormones on mouse mammary cancer cells in vitro. — *Arch. Jap. Chir.,* 1959, 28, 1595.

PAGE D. M., LAYON M. E. — Effect of cell density on growth in HeLa cells. — *Growth,* 1960, 24, 355.

PAINTER T. S. — Some cytological aspects of the nucleic acid problem. — *Texas Rep. Biol. Med.,* 1953, 2, 709.

PASIEKA A. E., MORTON H. S., MORGAN J. F. — The metabolism of animal tissues cultivated in vitro. III. Animo acid metabolism of strain L cells in completely synthetic media. — *Canada Journ. Biochem. Physiol.,* 1958, 36, 771.

PASIEKA A. E., MORTON H. J., MORGAN J. F. — The metabolism of animal tissues cultivated in vitro. IV. Comparative studies on human malignant cells. — *Cancer Research,* 1960, 20, 362.

PAUL J. — Nomenclature of cell strains. — *Virology,* 1958, 5, 175.

PICCO A., SOMAGLINO W., CUZZUPOLI F. — L'azione promovente dell' ormone follicolare nel duplice meccanismo di carcinogenesi dell' utero e vagina di ratte. — *Tumori,* 1959, 45, 303.

PICCO A., SOMAGLINO W., LASI C. — Ricerche sull'azione promovente della follicolina nel duplice meccanismo della carcinogenesi. — *Tumori,* 1958, 44, 173.

PLANEL H., DAVID J. F., SOLEILHAVOUP J. P. — Action comparée de l'œstradiol sur les souches tumorales HeLa et K.B. Différence de réactivité. — *C. R. Soc. Biol.,* 1961, 155, 135.

PLANEL H., DAVID J. F., SOLEILHAVOUP J. P. — Action de la progestérone sur les souches tumorales HeLa et K.B. — *C. R. Soc. Biol.,* 1961, 155, 1135.

PLANEL H., DAVID J. F., SOLEILHAVOUP J. P. — Action de la testostérone sur les souches cellulaires tumorales HeLa et K. B. — *C. R. Soc. Biol.,* 1961, 155, 1585.

PLANEL H., DAVID J. F., SOLEILHAVOUP J. P. — Etude, in vitro, de l'activité antimitotique du diethylstillbœstrol. — *XLVIII[e] Réunion de l'Asociation des Anat.,* Toulouse, avril 1962. (Sous presse.)

PODILCHAK M. D., KALYNYUK P. P. — Reaction of the ovaries to long-term administration of oestrogens. — *Folia Biol.,* 1959, 5, 458.

POLKINA R. I. — Morphological study of renal tumours induced by diethylstillboestrol in Cricetus auretus. (Texte russe.) — *Vopr. Onkol.,* 1959, 5, 32.

PRICE D., PANNABECKER R. — Organ culture studies of foetal rat reproductive tracts. — *Ciba Found. Colloq. Ageing,* 1956, 2, 3,

PRICE D., PANNABECKER R. — Comparative responsiveness of homologous sex ducts and accessory glands of foetal rats in culture. *Arch. Anat. Micro. Morph. exp.,* 1959, 48, 223.

PUCK T. T. — The genetics of somatic mammalian cells. — *Advances Biol. et Med. Phys.,* 1957, 5, 75.

— Growth and genetics of somatic mammalian cells in vitro. — *Journ. Cell. and Comp. Physiol.*, 1958 $_1$, 52, 287.

— Action of radiation on mammalian cells. III. Relationship between reproductive death and induction of chromosome anomalies by X-irradiation of euploid and human cells in vitro. — *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 1958 $_2$, 44, 772.

PUCK T. T., CIECIURA S. J., FISCHER H. W. — Clonal growth in vitro of human cells with fibroblastic morphology. Comparison of growth and genetic characteristics of single epitheloid fibroblast-like cells from a variety of human organs. — *Journ. Exp. Med.*, 1957, 106, 145.

PUCK T. T., CIECIURA S. J., ROBINSON A. — Genetics of somatic mammalian cells. III. A method for long-term cultivation of normal cells from large numbers of individuals and some application. — *Journ. Exp. Med.*, 1958.

PUCK T. T., Ph. D., FISCHER H. W. — Genetics of somatic mammalian cells. I. Demonstration of the existence of mutants with different growth requirements in a human cancer cell strain (HeLa). — *Journ. Exp. Med.*, 1956, 104, 427.

PUCK T. T., MARCUS P. I. — A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture ; The use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. — *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 1955, 41, 432.

PUCK T. T., MARCUS P. I. — Action of X-Rays on mammalian cells. *Journ. Exper. Med.*, 1956, 103, 653.

PUCK T. T., MARCUS P. I., CIECIURA S. J. — Clonal growth of mammalian cells in vitro. Growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a « feeder layer ». — *Journ. Exp. Biol. Med.*, 1956, 103, 273.

PUCK T. T., MORKOVIN D., MARCUS P. I., CIECIURA S. J. — Action of X-rays on mammalian cells. II. Survival curves of cells from normal human tissues. — *Journ. Exp. Med.*, 1957, 106. 485.

PULLINGER B. D. — Mammary tumors induced with ovarian hormones substituted after ovariectomy in R III f. virgin female mice. — *Brit. Journ. Cancer*, 1957, 11, 249.

PUMPER R. W. — Adaptation of tissue culture cells to a serum-free medium. — *Science*, 1958, 128, 363.

RABOTTI. — L'influenza degli ormoni ipofisari sulla crescita del carcinoma di Walker. I. Azione dell'A.C.T.H., dell'F.S.H., dell' I.C.S.H. — *Tumori*, 1956, 42, 811.

RAGAGLIA G., MARINUCCI M. — Azione di alcuni ormoni sulla carcinogenesis sperimentale della vescica. I. Azione del testosterone, del progesterone e dello stilbestrolo associato all'applicazione

locale di 3,4 benzopirene in coniglie e conigli normali. — *Riv. Pat. Clin.*, 1959, 14, 951.

RAPPAPORT C., POOLE J. P., RAPPAPORT H. P. — Studies on properties of surfaces required for growth of mammalian cells in synthetic medium. — *Exp. Cell. Res.*, 1960, 20, 465.

RICHARDSON F. L., ROSEOE B., JACKSON, BAR HARBOR. — Incidence of mammary and pituitary tumors in hydrid mice treated with stilboestrol for varying periods. — *Journ. Nat. Cancer Inst.*, 1957, 18, 813.

RIO F. — Progesterone e tumori sperimentali ; influenza dell'ormone del corpo luteo sullo sviluppo e sulla evoluzione dei tumori da idrocarburi cancerigeni nel ratto albino. — *Arch. ital. Patol. Clin. Tumori*, 1957, 1, 553.

— Progesterone e tumori : influenza dell'hormone del corpo luteo sull' attecchiniento e sviluppo dell'adenocarcinoma di Ehrlich nel topo bianco (innesto neoplastico eterogenice). — *Arch. ital. Patol. Clin., Tumori*, $1957_2$, 1, 584.

— Progesterone e tumori : influenza dell'hormone del corpo luteo sull' attecchiniento e sviluppo dell'adenocarcinoma di Ehrlich nel topo bianco (innesto neoplastico omologo). — *Arch. ital. Patol. Clin. Tumori*, $1957_3$, 1, 569.

RIVIÈRE M. R., CHOUROULINKOV I., GUÉRIN M. — Actions hormonales expérimentales de longue durée chez le hamster du point de vue de leur effet cancérigène. — *Bull. Assoc. franç. Cancer*, 1960, 47, 558.

ROBERTS S., SZEGO C. M. — Steroid interaction in the metabolism of reproductive target organs. — *Physiol. Rev.*, 1953, 33, 593.

ROHL L. — Prostatic hyperplasia and carcinoma studied with tissue culture technique. — *Acta Chir. Scand.*, 1959, 240, 88.

ROSE G. G. — A variant pinocytic cell (V.P. Cell) of Gey's strain HeLa selectively produced and stimulated by human serum nutrients. — *Texas Rep. Biol. Med.*, 1955, 13, 475.

— Cinematographic analysis of the mechanism of development of V.P. cells (variant pinocytic cells) in Gey's strain HeLa. — *Proc. Amer. Assoc. Cancer Research*, 1956, 2, 143.

— Observations on the dynamics of pinocytic and variant pinocytic (V.P.) cells in Gey's human malignant epidermoid strain HeLa. — *Texas Rep. Biol. Med.*, $1957_1$, 15, 313.

— Microkinetospheres and V.P. satellites of pinocytic cells observed in tissue cultures of Gey's strain HeLa with phase contrast cinematographic techniques. — *Journ. Biophys. Biochem. Cytol.*, $1957_2$, 3, 697.

— An appraisal of a biological response by strain HeLa cells in tissue culture to 100 human sera. — *Cancer Research*, 1958, 18, 411.

— Evidence for an intercellular exchange of cytoplasmic components between associated cells in tissue culture. — *Rep. Biol. Med.,* 1960, 18, 103.

ROSENTHAL W. — Wirkung von Menformen auf explantiertes Vaginalepithel. — *Acta Brev. neerl. Physiol.,* 1934, 4, 13.

ROTA M. — Azione di un nuovo ormone maschile sull' adenocarcinoma mammario murino coltivato in vitro. — *Tumori,* 1958, 44, 358.

ROUS P., JONES F. S. — A method for obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues, and for plating out of individual cells. — *Journ. Exp. Med.,* 1916, 23, 549.

ROY E. J., BROWN J. B. — *Journ. Endocr.,* 1960, 21, 9.

RUDALI G., JULLIEN P., JULIARD L. — Action des hormones sur la leucémogénèse des souris. — *Rev. franç. Et. Clin. Biol.,* 1959, 4, 607.

RUSKIN B., POMERAT C. M., RUSKIN A. — Toxicity of various cortisone preparations on embryonic chick, spleen, and spinal cord in tissue culture. — *Texas Repts. Biol. Med.,* 1951, 9, 786.

RUTENBERG A. M., SELIGNAN A. M. — New method for the histochemical demonstration of acid phosphatase. — *Journ. Histoch. Cytochem.,* 1954, 2, 445.

SAFRAN M., GRAD B., BAYLISS M. S. — Production of corticoids by rat adrenals in vitro. — *Endocrinol.,* 1952, 50, 639.

SANDRITTER W., SCHIEMER H. G., KRAUS H., DORRIEN U. — Interferenzmikroskopische Untersuchungen über das Wachstum von Einzelzellen (HeLa-Zellen) in der Gewebekultur. — *Frankfurt. Z. Pathol.,* 1960, 70, 271.

SANDFORD K. K., EARLE W. E., EVANS V. S., WALTZ W. K., SHANNON J. E. — The measurements of proliferation in tissue culture by numeration of cell nuclei. — *Journ. Nat. Cancer Inst.,* 1951, 11, 773.

SANFORD K. K., KATHERINE K., LIKELY, GWENDOLYN D., EARLE W. R. — The development of variations in transplantability and morphology within a clone of mouse fibroblasts transformed to sarcoma-producing cells in vitro. — *Journ. Nat. Cancer Inst.,* 1954, 15, 215.

SANFORD K. K., MENVIN R. M., HOBBS G. L., YOUNG J. M., EARLE W. R. Clonal analysis of variant cell lines transformed to malignant cells in tissue culture. — *Journ. Nat. Cancer Inst.,* 1959, 23, 1035.

SATO G., FISHER H. W., PUCK T. T. — Molecular growth requirements of single mammalian cells. — *Science,* 1957, 126, 961.

SAVARD K., MASON N. R., INGRAM J. T., GASSNER F. X. — The andro-

gens of bovine spermatic venous blood. — *Endocrinology,* 1961, 69, 324.

SCHABERG A. — The influence of ACTH and the anterior lobe of the hypophysis on the adrenal cortex in vitro. — *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet.,* 1957, 60, 463.

SCHEIB-PFLEGER D. — Contribution biochimique à l'étude des processus de différenciation des canaux de Muller chez l'embryon de poulet. — *Bull. Biol. Fr. Belg.,* 1955, 89, 404.

SCOTT T. M., WRYK M. A., DORSEY J. M., SIGEL M. M. — Transplantation of human malignant epithelial cells from tissue culture to rat brains. — *Cancer Res.,* 1960, 1, 58.

SCOWEN E. F., HARDFIELD J., DONATH E. — The response of the mammary gland of the male mouse to progesterone and human mammotrophic substances. — *Journ. endocr.,* 1959, 18, 26.

SEMURA S. — Uber den Einfluss des Antuitrins und des thyroxine auf das Vachstum der in vitro-Kulturen von fibroblasten. — *Arch. exp. Zellforsch,* 1931, 10, 329.

SHIMKIN M. B., CANTER H. Y. — The growth of oestrogne-induced interlitial-cell testicular tumors in BALB/C mice. — *Journ. nat. Cancer Inst.,* 1960, 24, 1219.

SIDMAN R. L. — Direct effect of insulin on organ cultures of brown fat. — *Anat. Record,* 1956, 124, 723.

SMITH G. G., LUMMIS W. L., GRADY J. E. — An improved tissue culture assay. I. Methodology and cytoxicity of antitumor agents. II. Cytotoxicity studies with antibiotics, chemicals, and solvants. — *Cancer Research,* 1959, 19, 843.

SMITH C. G., LUMMIS W. L., GRADY J. E. — Studies on the growth of human carcinoma cells in tissue culture. — *Cancer Research,* 1960, 20, 212.

SOKOLOWSKY R. M. — L'induction de pseudo-érosions du col utérin chez la souris (texte russe). — *Vopr. Onkol.,* 1959, 5, 325.

SOMEYA Y. — Antagonistic effects between sex hormones on the multiplication of strain HeLa cells (cervical carcinoma of human uterus) in tissue culture. *Japon Journ. Exj. Med.,* 1960, 30, 193.

SOMMERS S. C., MEISSNER A. — Host relationship in experimental endometrial carcinoma. — *Cancer,* 1957, 10, 510.

STEIN-WERBLOWSKY R. — Induction of cancer of the cervix uteri in relation to the oestrus cycle. — *Brit. Journ. Cancer,* 1960, 14, 300.

STULBERG C. S., BERMAN L. — Isolation, maintenance, and preservation of human cell strains. — *Bull. med. Univers. Michigan,* 1958, 24, 179.

TAKANO K., YAMADA M. A., YAGINUMA K. — Growth estimation of

HeLa strain cells in tissue culture by nucleus enumeration method. — *Japonese Journ. of Med. Sc. and Biol.*, 1956, 9, 17.

TAKAOKA T., KATSUTA H., FURUKAWA T., KAWANA M. — A subline of strain HeLa cells with glass-attaching ability in a protein-free medium. — *Japonese Journ. of Experimental Medecine*, $1960_1$, 30, 319.

TAKAOKA T., KATSUKA H., KANEKO K., KAWANA M., FURUKAWA T. — Nutritional differencies among lactalbumin hydrolysate products for tissue culture. — *The Jap. Journ. of Exp. Med.*, $1960_2$, 30, 397.

THOMAS W. J. — The role of arginine in the submerged culture of mammalian cells. — *Dissert. Abstr.*, 1959, 20, 1552.

TIMONEN S., THERMAN E., OKSALAT T. — Recherches sur la cytologie du Cancer. — *Sem. Hôp. supp. med. dans le monde*, 1956, 32, 44.

TONDURY G. — *Rev. Suisse Zoll.*, 1940, 47, 161.

TOOLAN H. W. — Proliferation and vascularization of adulte human epithelium in subcutaneous tissues of X-irradiated heterologous hosts. — *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1951, 78, 540.

— Successful subcutaneous growth and transplantation of human tumors in X-irradiated laboratory animals. — *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, $1951_2$, 77, 572.

— Growth of human tumors in the subcutaneous tissues of X-irradiated laboratory animals; their practical use for experimental purposes. — *Cancer Research*, 1952, 12, 302.

— Growth of human tumors in cortisone treated laboratory animals; the possibilité of obtaining permanently transplantable human tumors. — *Cancer Research*, $1953_1$, 13, 389.

— Conditioning of the host. — *Journ. nation. Cancer Inst.*, $1953_2$, 14, 745.

TRENTIN J. J., GARDNER W. U. — Site of gene action in susceptibility to oestrogen-induced testicular interstitial-cell tumors of mice. — *Cancer Res.*, 1958, 18, 110.

TROWELL O. — The action of cortisone on lymphocytes in vitro. — *Journ. Physiol.*, 1953, 119, 274.

VALERIO M. — Influenza dell'ormone somatotropo sulla crescita dei fibroblasti di cuore di embrione di pollo « in vitro ». — *Tumori*, 56, 42, 591.

VAN DUIJN C. J. — Bauer-Schiff and periodic acid Schiff polysaccharose reactions in some normal and malignant cell types. *Mikroskopic*, 1955, 10, 75.

VAN HAMM E., CAPPEL L. — Effect of hormones on cell growth in vitro. — *Amer. Journ. Cancer*, 1940, 39, 354.

VELDHUIS A. H. — A chemical method for the determination of oestrogens in plasma. *J. B. C.*, 1953, 202, 107.

VERNE J. — Observations sur le comportement de l'épithélium utérin dans les cultures in vitro. Action de la folliculine. — *C. R. Assoc. Anat.*, 1935, 30, 514.

VILLEE C. A. — Effects of oestrogens and anti-oestrogens in vitro. *Cancer Res.*, 1957, 5, 507.

VIOLANTE A., MAZZEO F., LORENZUTTI G., SAPIO U. — Influenza del testosterone sullo sviluppo di una leucemia del rato : il cloromieloma di Oberling e Guerin. — *Sintesi*, 1958, 2, 55.

VIOLANTE A., SAPIO U., MAZZEO F. — Studio delle influenze endocrine su di una emopatia maligna del ratto : il mieloma di Oberling, Guerin e Guerin. Azione del testosterone e della follicolina su ratti maschi e femine. — *Sintesi*, 1959, 3, 16.

VON MOLLENDORFF W. — Zur Keuntnis der Mitose XII. Fortgesetzte untersuchungen über den Einfluss von Kohlenwasserstoffen und steroiden auf das wachstum. Wersuche an Gewebekulturen und Froschlaich. Beziehungen zum bösartigen Wachstum. Z. Zellforsch, 1942, 32, 35.

WAGENSEIL F. — Untersuchungen über das Wachstum du Ratten-Prostata in der Gewebekultur. — *Z., Mikr.-anat. Forsch*, 1956, 1956, 62, 451.

WALTHER L. — Intratumorale Karzinombehandlung mit männlichem Hormon. — *Ibl. Gynäk*, 1958, 80, 1953.

— Schwainden von Carcinomgewebe durch intratumorale Testosid-Injektionen. — *Arch. Geschwilst forsch*, 1959, 15, 324.

WILDY P., STOKER M. — Multiplication of solitary HeLa cells. — Nature, 1958, 181, 1407.

WOLFF Em. — La différenciation sexuelle normale et le conditionnement hormonal des caractères sexuels somatiques précoces, tubercule génital et syrinx chez l'embryon de Canard. — *Bull. Biol. France Belgique*, 1950, 84, 119-193.

WOLFF E., HAFFEN K. — Sur la différenciation sexuelle des gonades embryonnaires de l'embryon de Poulet en culture in vitro. — *Ann. d'endocrinol.*, 1952, 13, 724.

WOLFF E., LUTZ-OSTERTAG Y., HAFFEN K. — Sur la régression et et la nécrose in vitro des canaux de Müller de l'embryon de Poulet sous l'action directe des hormones mâles. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, 146, 1793.

WOLFF Et., WOLFF Em. — Cultivation and differentiation of the syrinx of the duck embryo cultivated in vitro. — *Poultry Science*, 1953, 32, 348.

— La propagation d'une souche de cancer humain sur des organes embryonnaires de Poulets cultivés in vitro. — *C. R. Séances Acad. Sc.*, 1958, 246, 1116.

— Sur le comportement des souches cancéreuses humaines en association avec des organes embryonnaires de Poulet cultivés in vitro. — *Cancer Res. Soc. Biol.*, 1959, 153, 1898.

WOLFSON N. I. — Ifluence du proprionate de testostérone sur l'induction de tumeurs du col utérin et du vagin de souris. (Texte russe). — *Vopr. Onkol.*, 1960, 6, 15.

— L'influence de quelques androgènes sur le développement de tumeurs mammaires de la souris. (Texte russe). — *Vopr. Onkol.*, 1958, 4, 543.

WORDEN J. D. — Proliferation of mammalian cells in controled environments. — *Journ. Nat. Cancer. Inst.*, 1961, 26, 801.

YAMADA M. A. — The morphological variety of HeLa cells in vitro. *Jap. Journ. Med. Sci. Biol.*, 1959, 12, 145.

YAMADA M. A., TAKANO K. — Growth curve of HeLa strain cells in tissue culture. — *Jap. Journ. Med. Sci. Biol.*, 1956, 9, 27.

YUDAEV N. A., DRUZHININA K. V. — Possibilités d'utilisation des androgènes et des oestrogènes dans la biosynthèse des hormones de la glande surrénale. (Texte russe). — *Probl. Endokr.*, 1958, 4, 21.

# TABLE DES MATIÈRES


**AVANT-PROPOS** . . . . . 7

**PLAN** . . . . . 11

**INTRODUCTION** . . . . . 13

**RAPPEL DES RECHERCHES ANTERIEURES** . . . . . 15

I. — Action des hormones en culture d'organes . . . . . 15

1) Les hormones en général . . . . . 15

2) Les hormones génitales . . . . . 17
— œstradiol . . . . . 17
— progestérone . . . . . 19
— testostérone . . . . . 19

II. — Action des hormones en culture histiotypique . . . . . 20

A. Cultures de fibroblastes . . . . . 20
— les hormones en général . . . . . 20
— les hormones génitales . . . . . 23

B. Cultures d'autres types cellulaires . . . . . 24

III. — Action des hormones en culture de tissus cancéreux. 26

1) Les hormones en général . . . . . 26

2) Les hormones génitales . . . . . 27
— l'adénocarcinome d'Ehrlich . . . . . 28
— les tumeurs expérimentales . . . . . 29
— les souches celullaires . . . . . 29

**LES SOUCHES CELLULAIRES** . . . . . 31

**La souche HeLa de Gey** . . . . . 32

I. — Origine . . . . . 32
II. — Morphologie . . . . . 33

1) Morphologie des cellules HeLa ..... 33
— cytoplasme ..... 33
— noyau ..... 34
2) Morphologie des cultures ..... 35

III. — Caractères histochimiques ..... 35
1) Les composés lipidiques ..... 35
2) Les composés glucidiques ..... 36
3) Les acides nucléiques ..... 36
4) Les phosphatases ..... 36

IV. — Caractères physiologiques ..... 36
— phagocytose ..... 37
— pinocytose ..... 37
— amiboïsme ..... 37
— adhérence en culture ..... 38

V. — Croissance ..... 38
1) Division cellulaire ..... 38
— directe ..... 38
— indirecte ..... 39
2) Croissance des cultures ..... 39
— caractères généraux ..... 39
- - les facteurs de croissance ..... 41
. facteurs métaboliques ..... 41
. richesse de l'inoculum ..... 42
— le vieillessement des cultures ..... 43

VI. — Stabilité ..... 44
1) Caractères de stabilité ..... 44
2) Caractères d'instabilité ..... 46
3) Discussion ..... 50

**La souche K.B. de Eagle** ..... 57
I. — Origine ..... 57
II. — Morphologie ..... 57
1) Morphologie de la cellule K.B. ..... 57
— cytoplasme ..... 57
— noyau ..... 58
2) Morphologie des cultures ..... 59

III. — Caractères histochimiques ..... 59
1) Les composés lipidiques ..... 59
2)) Les composés glucidiques ..... 59
3) Les acides nucléiques ..... 60
4) La phosphatase alcaline ..... 60

IV. — Caractères physiologiques . . . . . 60
V. — Croissance . . . . . 61
1) Division cellulaire . . . . . 61
2) Croissance des cultures . . . . . 62
VI. — Stabilité . . . . . 63

**LES TECHNIQUES DE CULTURE** . . . . . 65

I. — Les milieux . . . . . 66
1) Milieu de culture du stock cellulaire . . . . . 66
2) Milieu de culture expérimental. Concentrations hormonales . . . . . 67

II. — Techniques de culture . . . . . 68
1) Entretien des stocks cellulaires . . . . . 68
2) Techniques exérimentales . . . . . 69

III. — Méthodes d'appréciation de la croissance cellulaire. 70
1) Numération cellulaire et index cinétique . . . . . 70
2) Autres méthodes . . . . . 71
— tomophotométrie . . . . . 71
— hématimétrie . . . . . 71

**LES RESULTATS** . . . . . 73

I. — Cultures témoins et de contrôle . . . . . 74
II. — Etude analytique de l'action hormonale sur les deux souches . . . . . 74
1) Souche cellulaire HeLa . . . . . 74
— action de l'œstradiol . . . . . 74
— action de la progestérone . . . . . 78
— action de la testostérone . . . . . 78
2) Souche cellulaire K.B. . . . . 80
— action de l'œstradiol . . . . . 80
— action de la progestérone . . . . . 81
— action de la testostérone . . . . . 82

III. — Etude comparative des résultats . . . . . 83
— Les trois hormones vis-à-vis de la souche HeLa. 84
— Les trois hormones vis-à-vis de la souche K.B. 84
— L'œstradiol sur les deux couches . . . . . 86
— La progestérone sur les deux souches . . . . . 87
— La testostérone sur les deux souches . . . . . 87

**DISCUSSION** . . . . . 89

I. — Valeur des méthodes expérimentales . . . . . 89
Concentrations hormonales physiologiques et concentrations hormonales in vitro. Le rôle possible du solvant . . . . . 89

II. — Les recherches antérieures sur l'action des hormones génitales au niveau de la souche HeLa ..... 94

III. — L'action classique des hormones sexuelles in vivo et in vitro suivant le type de culture ..... 97

IV. — Les variations de l'activité hormonale suivant l'unité biologique en cause. La différence de réceptivité entre les cellules HeLa et K.B. ..... 104

V. — L'index cinétique et le mécanisme de l'activité hormonale sur les souchès HeLa et K.B. ..... 114

**CONCLUSIONS GENERALES** . . . ..... 118

**DOCUMENTS BIBLIOGRAPHIQUES** . ..... 122

Dépôt légal : 2e trim. 1962 — Aa 384

Imp. Toulousaine, Vve LION, 16, rue Lakanal, Toulouse.